

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE**

**Biologický účinek rostlinných metabolitů I.
Izolace alkaloidů z *Eschscholzia californica* Cham.**

**Biological effect of plant metabolites I.
Isolation of alkaloids from *Eschscholzia californica* Cham.**

Diplomová práce

Hradec Králové 2009

Martina Křečková

Ráda bych touto cestou poděkovala PharmDr. Janě Karličkové, Ph.D. za odborné vedení a za všestrannou pomoc při vypracování této diplomové práce. Děkuji Doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za poskytnutí cenných rad a paní laborantce Ireně Rejlové za pomoc při měření teploty tání.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Martina Křečková

1	Úvod a cíl práce.....	6
2	Teoretická část.....	9

2.1	Charakteristika druhu.....	10
2.1.1	Systematické zařazení	12
2.1.2	Botanický popis	13
2.1.2.1	Ekologie	13
2.1.2.2	Rozšíření.....	13
2.1.3	Charakteristika drogy – <i>Eschscholziae herba</i>	14
2.2	Obsahové látky rostliny.....	17
2.2.1	Izochinolinové alkaloidy (Benzyltetrahydroizochinoliny)	19
2.2.1.1	Jednoduché benzylozochinoliny	23
2.2.1.2	Bisbenzylozochinoliny	25
2.2.1.3	Aporfinoidy	26
2.2.1.4	Protoberberiny a jejich deriváty	27
2.2.1.5	Morfinany	29
2.2.2	¹⁵ N NMR studium isochinolinových alkaloidů	30
2.2.3	Flavonoidy	32
2.3	Biologická účinnost a klinické použití popsané v literatuře.....	34
2.4	Dvojitě zaslepená, randomizovaná, placebo kontrolovaná studie hodnotící účinnost a bezpečnost přesně stanoveného množství kombinace extraktů z rostlin <i>Crataegus oxyacantha</i> a <i>Eschscholzia</i> <i>californica</i> a magnesia u mírných a středně mírných úzkostí.....	38
2.4.1	Úvod.....	40
2.4.2	Výsledky	42
2.4.3	Účinnost	44
2.4.4	Bezpečnost.....	45
2.4.5	Diskuze	51
2.4.6	Závěr	54
2.4.7	Poděkování	54
2.4.8	Literatura	55
2.5	Metody použité k testování	57
2.5.1	Extrakce	57
2.5.2	Filtrace za sníženého tlaku (odsávání).....	57
2.5.3	Odpařování za sníženého tlaku	57
2.5.4	Chromatografie.....	58
2.5.4.1	Kolonová(sloupcová) chromatografie	59
2.5.4.2	Chromatografie v plošném uspořádání	59
2.5.4.2.1	Tenkvrstvá chromatografie (Thin-Layer chromatography TLC).....	59
2.5.5	Krystalizace	60
3	Experimentální část	62
3.1	Charakteristika zpracovaného materiálu.....	62
3.2	Rozpouštědla, chromatografický materiál a přístroje	62
3.2.1	Rozpouštědla	62
3.2.2	Chromatografický materiál.....	63
3.2.3	Přístroje	63
3.2.4	Laboratorní sklo a další pomůcky.....	64
3.2.5	Vyvíjecí soustavy a detekční činidla	65
3.3	Postup extrakce alkaloidů z <i>Eschscholzia californica</i> Cham.....	68
3.3.1	Původ drogy	68
3.3.2	Příprava primárního extraktu a jeho čištění	68
3.3.3	Příprava alkaloidního výtřepku J1	68

3.4	Schéma přípravy výtřepku alkaloidů	69
3.5	Celkové schéma zpracování materiálu	71
3.6	Izolace obsahových látek pomocí preparativní chromatografie	74
4	Výsledky měření.....	89
4.1	Výsledné chromatogramy	89
4.2	Hodnocení výsledků chromatografie.....	92
4.3	Teplota tání standardů	93
4.4	Antioxidační aktivita	93
5	Diskuse a závěr	96
6	Abstrakt	99
7	Literatura	100
8	Abstract	106

1 Úvod a cíl práce

Úvod

Jedním z velmi významných problémů současného světa je rozpor mezi narůstající průměrnou délkou života, která je doprovázena vývojem významných degenerativních onemocnění a zaostáváním sociálních postojů a farmaceuticko-lékařského výzkumu.¹ Mezi degenerativní onemocnění centrálního nervového systému patří především Alzheimerova a Parkinsonova choroba. Alzheimerova choroba tvoří 50% - 60% všech demencí.²

Zejména v tzv. západní civilizaci je udržován více než před 20 až 30 lety nezdravý styl života spočívající v nadměrné konzumaci alkoholu, nedostatku fyzického pohybu, nikotinismu, málo vyvážené stravě a stresu, které k vývoji civilizačních chorob přispívají.¹

Je nutné říci, že patofyziologickou oblastí, která se začíná plíživě rozšiřovat, jsou neurodegenerativní onemocnění zejména Alzheimerova choroba. Kauzalita této nozologické jednotky je složitá; u pozdní demence (nad 60. rokem života) se u ní významně uplatňuje genetický polymorfismus, který je spouštěčem rizikových faktorů nebo genetických modifikací (komplex těchto heterogenních onemocnění zahrnuje mozkovou příhodu, aterosklerózu, diabetes mellitus, zhoubné nádory, úrazy hlavy aj.). Tento typ onemocnění, pro nás důležitý zahrnuje zhruba 95% všech demencí Alzheimerova typu. Naopak časných demencí (presenilních, vznikajících před 60. rokem života pacienta) je maximálně 5%. Ačkoliv každoročně vychází ve světové literatuře několik velmi pěkných a vysoce odborných přehledných studií, shrnujících živě poslední výsledky výzkumu, významný pokrok v oblasti farmakoterapie Alzheimerovy choroby je nadále zamlžen. Přes intenzivní výzkum je stále málo léčiv, která by splňovala naše potřeby.¹

Výzkum látek s velkou budoucností v léčbě Alzheimerovy choroby je soustředěn do pěti oblastí:

- látky ovlivňující osud acetylcholinu a isoform acetylcholinesterasy v mozku (inhibitory acetylcholinesterasy)
- inhibitory ACAT (inhibitory Acyl-CoA cholesteryl acyl transferasy)
- ovlivnění produkce β – amyloidu v mozkové kůře
- neuroprotektiva
- inhibitory prolylendopeptidasy (PEPI) ¹

Naše katedra farmaceutické botaniky a ekologie se pustila do hledání přírodních látek, které by mohly potenciálně usnadnit léčbu této choroby. Dosud se nepodařilo najít účinný lék proti této nemoci. Stále probíhá intenzivní výzkum látek, které umožňují zpomalit průběh tohoto onemocnění, případně jsou schopné chorobu zastavit.

Do skupiny látek, které inhibují acetylcholinesterasu, patří mimo jiné látky i alkaloidy z taxonů *Eschscholzia californica* Cham. z čeledi Papaveraceae.

Cíl

Cílem této diplomové práce je:

- A. zpracovat výtřepek J1, kvarterní jodidy kyselé, získaný ze suché nati s kořeny z taxonu *Eschscholzia californica* Cham.
- nalézt vhodnou dělicí soustavu pro chromatografický sloupec
 - provést vlastní chromatografické dělení
 - izolovat alespoň jeden čistý kvarterní alkaloid
- B. provést identifikaci získaného alkaloidu
- C. podílet se na stanovení aktivity izolovaného alkaloidu vůči erytrocytární acetylcholinesterase

2 Teoretická část

2.1 Charakteristika druhu



Obr. č.1: *Eschscholzia californica* Cham.³⁰

Sluncovka, je malá rostlina, která zkrášluje mnoho zahrad v Evropě svými oranžovými květy. Pochází z Kalifornie, kde roste na rozsáhlém území, od pobřežních dun, planin až po vyprahlá údolí. Je to jednoletá bylina. Má charakteristické modro-zelené listy, které jsou rozděleny do lineárních segmentů a květy se čtyřmi okvětními lístky, které opadávají, a které se uzavírají při soumraku. Četné tyčinky obklopují jednopouzdrý semeník, který se mění na lineární tobolku, která se otevírá pomocí dvou záklopek.



Obr. č.2: *Eschscholzia californica* Cham.³¹



Obr. č.3: *Eschscholzia californica* Cham.³¹

2.1.1 Systematické zařazení

Systematické zařazení *Eschscholzia californica*

- Říše:** Plantae (rostliny)
Oddělení: Magnoliophyta (krytosemenné)
Třída: Magnoliopsida (dvouděložné)
Podtřída: Ranunculidae
Řád: Papaverales (mákotvaré)
Čeleď: Papaveraceae (mákovité)
Rod: *Eschscholzia* (sluncovka)
Druh: *E. californica* (sluncovka kalifornská)⁴

Druh obsahuje četné ekotypy a více cytotypů, které se podle daného přístupu dělí na poddruhy nebo jsou pojednávány jako souborný druh.

Původně jako vlastní druh popsána *E. mexicana* Greene je po experimentu křížením považována za poddruh *E. californica*. Druh se rozpadá na dva od sebe zeměpisně oddělené poddruhy *Eschscholzia californica* (Greene) ssp. *californica*, rozšířená v Kretonu a Kalifornii, a *Eschscholzia californica* ssp. *mexicana* (Greene) C. Clark [syn.: *E. donglasii* (HOOK. et ARN) WALP] s hlavním výskytem, v Novém Mexiku, Texasu a Severním Mexiku. Pro oblast Baja Kalifornie je popsána varieta *Eschscholzia californica* Cham. var. *peninsularis* (Greene) Munz.

Druh pěstovaný v Evropě od poloviny 19. století jako okrasná rostlina pod názvem *Eschscholzia californica* je křížencem různých poddruhů resp. variet druhu *Eschscholzia californica*.⁵

2.1.2 Botanický popis

0,1 až 0,6 m vysoká, jednoletá (*ssp. mexicana*) nebo jedna až víceletá (*ssp. californica*) bylina. Lodyha přímá nebo vystoupavá. Listy jsou řídke, hustě ochlupené, peřenodílné s čárkovitými úkrojky, barva modro-zelená. Květy jednotlivé, stopkaté. Korunní lístky nejčastěji oranžově žluté, na bázi tmavší. Plodem je tobolka. U nás kvete od června do října, v subtropických oblastech už od února.³¹

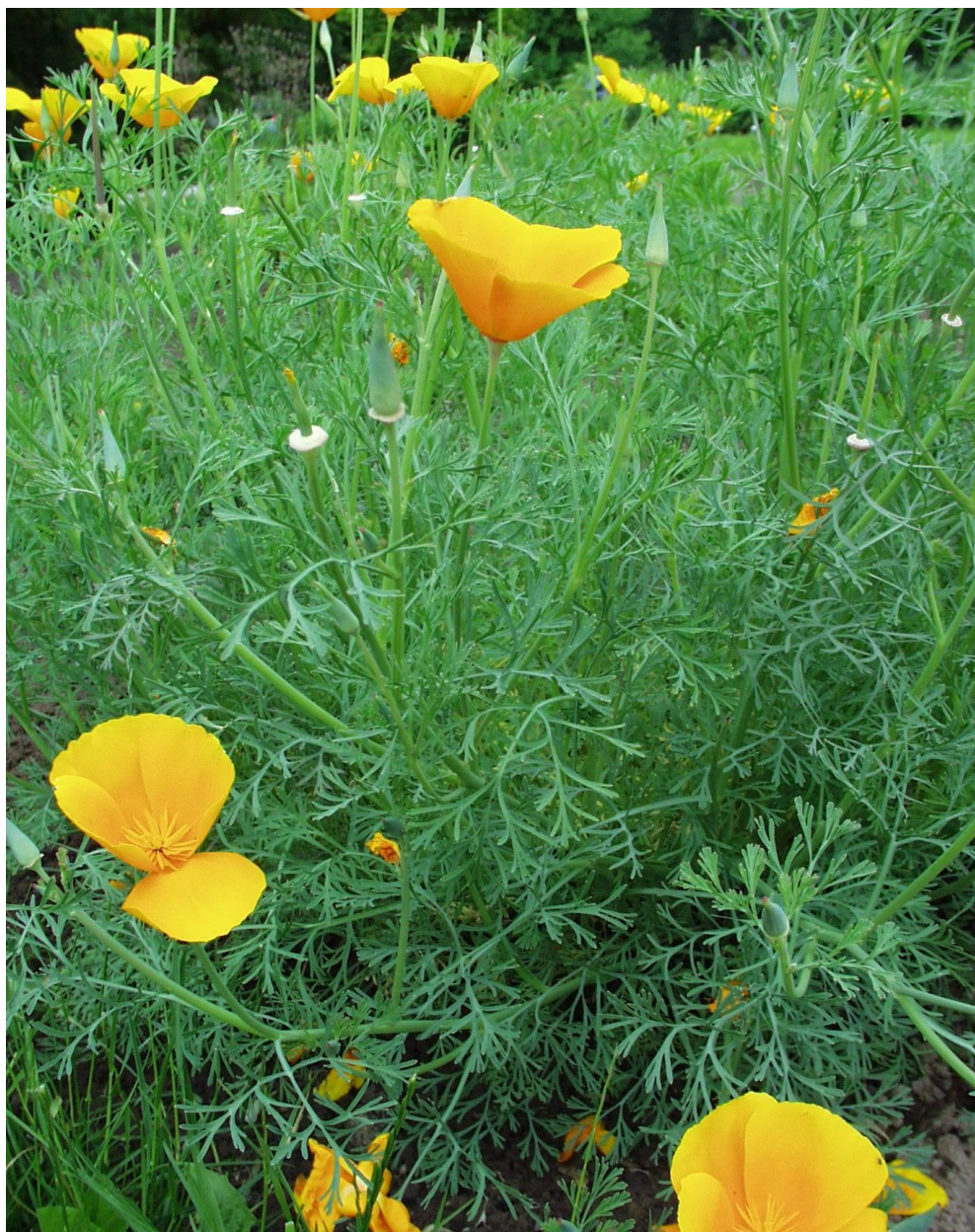
2.1.2.1 Ekologie

Roste na suchých stráních a skalách, často také v pouštních oblastech, v pásmu od pobřeží až do výšky 2000 m n.m.³¹

2.1.2.2 Rozšíření

Západní státy USA (od kalifornského pobřeží po západní Texas) a severozápadní Mexiko. Do Evropy byl druh přivezen zřejmě na konci 19. století (Anglie), záhy se stal oblíbenou zahradní letničkou. Postupně se rozšířil do řady subtropických oblastí světa, kde začal zplaňovat. U nás se v posledních letech začíná stále častěji objevovat v zahradách, kde se pěstuje jako dekorativní letnička.³¹

2.1.3 Charakteristika drogy – *Eschscholziae herba*



Obr. č.4: *Eschscholzia californica* Cham.³⁰



Obr. č.5: *Eschscholzia californica* Cham.³¹

Označení v dalších jazycích: California poppy leaves (anglicky)

Herbe de globe du soleil (francouzky)

Eschscholzienkraut (německy)⁵

Definice: jedná se o sbírané a sušené nadzemní části *Eschscholzia californica* Cham. v době květu.⁵

Makroskopický popis: Převažující podíly stonků. Lodyha dutá, s 8 až 12 bělavými a nažloutlými kolenchymovými žebry. Žluté až oranžové květy. Šedozelené, silně ochlupené zpeřené listy se lehce rozpadají.⁵

Mikroskopický obraz: Na listu jsou štěrbinové otvory na svrchní a spodní straně rovnoměrně rozděleny. Uzavírací buňky mají občas polygonální obrys. Stavba listu je ekvifaciální. Svrchní palisádové pletivo je složeno ze 3 řad rovnoměrných buněk. Květní stonky mají zřetelné asimilační pletivo. Jen u mladých stonků se nalézají četné mléčné trubice.⁵

Použití: Ve farmacii a medicíně. Příležitostně se používá jako náhrada za marihuanu. V zemědělství se pěstuje jako okrasná rostlina, v mnoha barevných variantách.⁵

Lidová použití a jiné oblasti využití: Droga řídce ordinovaná, přesto je součástí již hotových léčivých preparátů, často v kombinaci s rostlinnými sedativy. Slouží k léčbě spánkových poruch, bolestí, vznětlivosti, neuropatií, jaterních a žlučnickových onemocnění a nočnímu pomočování u dětí. V Americe se používá k přípravě léčiva při poruchách spánku dětí, ve Francii při nervozitě.⁶

Dávkování a způsob užití drogy: Příprava čaje: 2g na 150ml vody⁷

Extrakt: dávkování 1 až 2ml⁸

2.2 Obsahové látky rostliny

Eschscholzia californica (sluncovka kalifornská) obsahuje izochinolinové alkaloidy^{9,10} nejdůležitější z nich jsou protopin, chelidonin, chelerythrin¹¹, makarpin, kryptopin, alokryptopin a sanguinarin¹². Další alkaloidy, které byly nalezené v *Eschscholzia californica* jsou 10-OH-sanguinarin, 12-OH-chelirubin a 10-OH-chelerythrin (benzofenantridin) a 10-OH-dihydrosanguinarin a 12-OH-dihydrochelirubin (dihydrobenzofenantridin).¹³ Tato rostlina také obsahuje karotenoidy, flavonoidy¹⁴ a kyanidinové heterosidy.

Na základě chromatografického rozlišení alkaloidní frakce celé rostliny došlo k izolaci (\pm)-cheilanthifolinu, hunnemaninu a norsanguinarinu, které byly plně popsány komplexní spektrální analýzou a srovnávány se standardními vzorky. Toto je první zpráva o izolaci (\pm)-cheilanthifolinu a hunnemaninu z této rostliny.¹⁵

E. californica byla sbírána v prostorách Banaras Hindu University a identifikována na katedře botaniky této vysoké školy. Vzorek č. 133 je uchován v herbáři na této katedře. Izolováním alkaloidů z metanolického extraktu celé rostliny, které následovalo po obvyklém postupu a chromografickém rozlišení surového základu přes silikagel, došlo k izolování (\pm)-cheilanthifolinu z eluens benzen:chloroform (1:3), hunnemaninu z eluens chloroform-metanol (95:5) a norsanguinarinu z eluens chloroform-metanol (1:1).¹⁵

Chemické složení

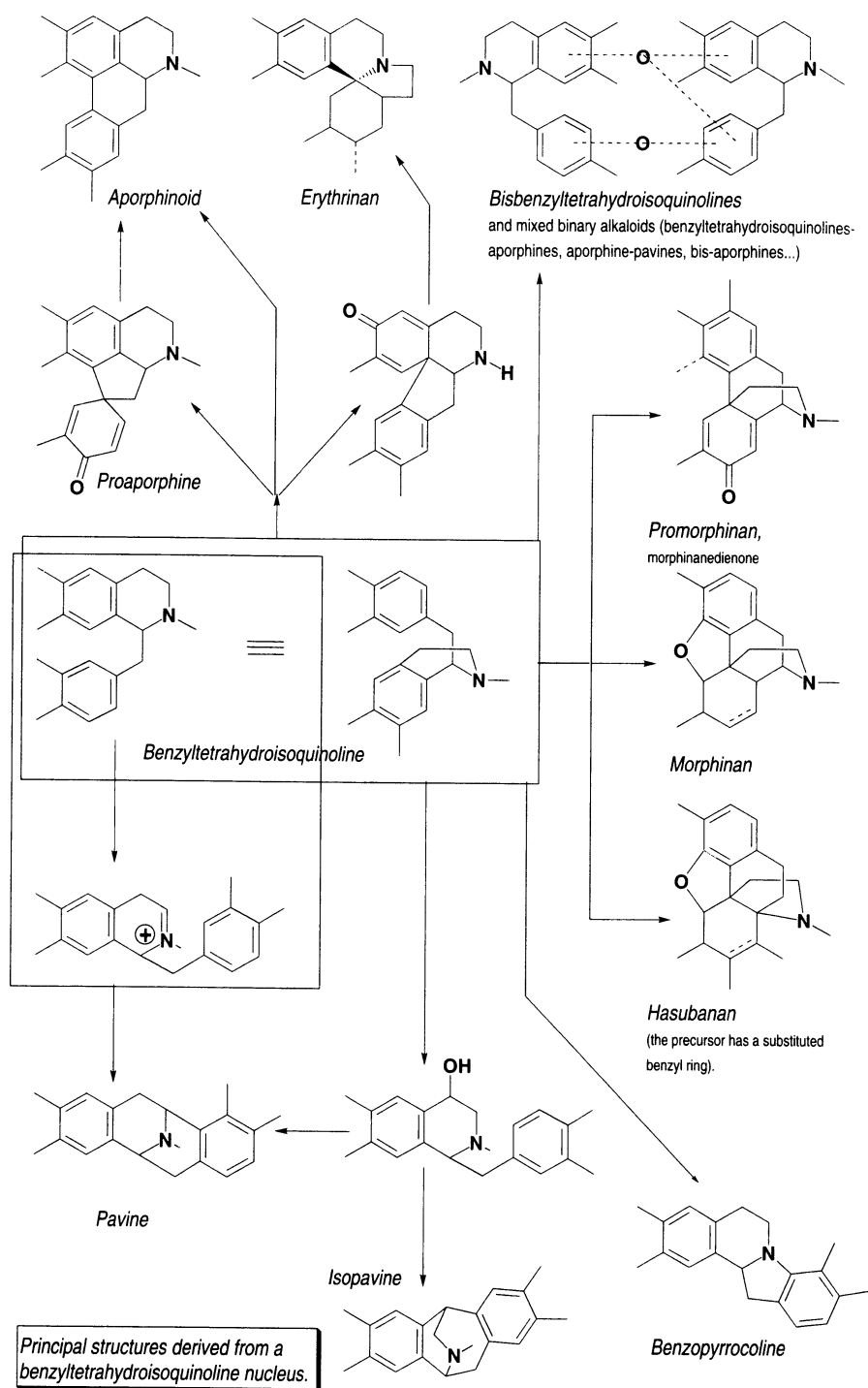
Složení drogy je poměrně dobře známé, alespoň co se alkaloidů týká. Kromě pavinů, které převládají a jsou charakteristické pro tento rod (eschscholzin, kalifornidin), byly také izolovány protopiny a aporfiny (N-methylaurotetanin); benzofenantridiny (sanguinarin, chelerythrin) se objevují jen v malém množství v listech a ve stonku, ale jsou společně s alokryptopinem a protopinem hlavními alkaloidy v kořenech (ve kterých je koncentrace celkových alkaloidů mnohem větší než ve stoncích [$>2.5\%$]). Droga je identifikována na základě TLC (thin-layer chromatography) analýzy svých celkových alkaloidů, svých makroskopických vlastností a mikroskopickým vyšetřením svého prášku. Nesmí obsahovat méně než 0.5% celkových

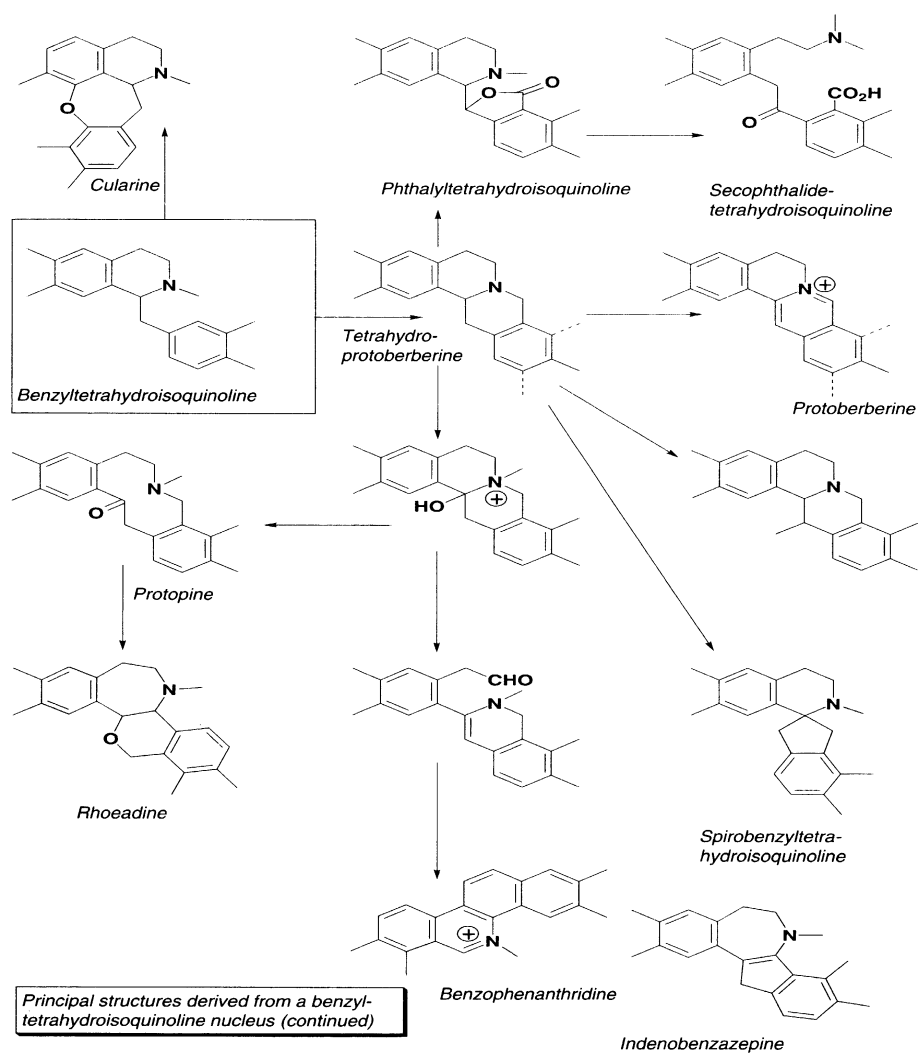
alkaloidů: alkaloidy jsou extrahovány v metanolu, izolovány jako jodortuťnatany za přítomnosti kyseliny chlorovodíkové a titrovány acidimetrií v bezvodém prostředí po výměně iontů na silikagelu.³

Další aktivní sloučeniny jsou flavonoidy, které se objevují hlavně jako glykosidy kvercetinu a isorhamnetinu¹⁶. V této rostlině byl také nalezen flavonoid rutin.¹⁴

2.2.1 Izochinolinové alkaloidy (Benzyltetrahydroizochinoliny)

Jen monoterpenové indolové alkaloidy předčí rozmanitostí své struktury alkaloidy odvozené z 1-benzylizochinolinu: dvě schéma uvedená níže přehledně zobrazují hlavní struktury, které existují a jejich biogenetický původ z běžného prekursoru.³

Schéma č.1³

Schéma č.2³

Oxidační kopulace

Výše zmíněná rozmanitost struktury vyplývá z vyšší reaktivity fenolů, zejména jejich kopulační oxidace přes radikálové meziprodukty: toto je klasická oxidační kopulace fenolů. Fenolový radikál, který vzniká při oxidaci fenolu, a který je stabilizovaný resonancí je vysoce reaktivní: v závislosti na tom zda je do kopulace zapojen fenolový radikál a jeho mezomery nebo jen jeho mezomery. Výsledkem je buď vytvoření difenyleterové vazby (Ar-o-Ar), nebo vazby difenyl uhlík-uhlík (OH-Ar-Ar-OH).³

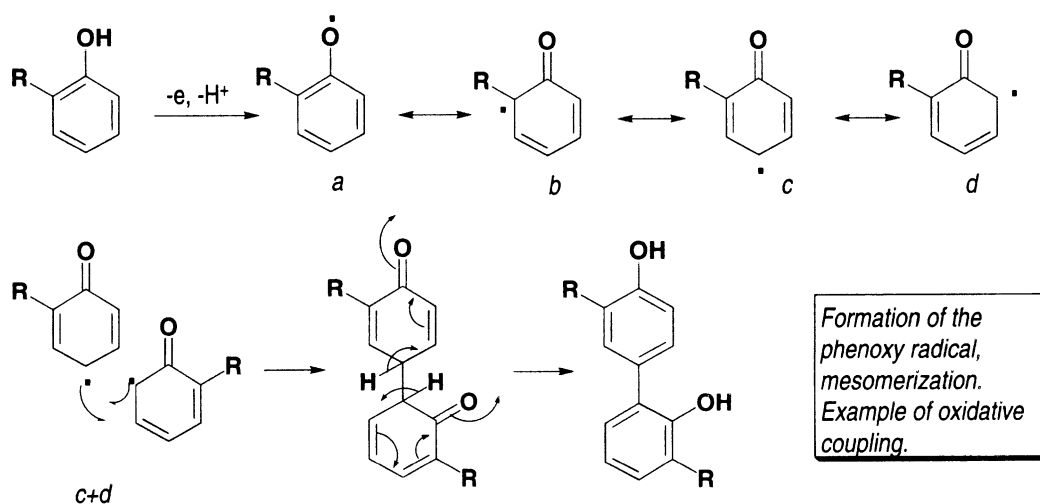


Schéma č.3³

2.2.1.1 Jednoduché benzylizochinoliny

Většina těchto jednoduchých sloučenin jsou 1,2,3,4-tetrahydroderiváty, jinými slovy řečeno benzyltetrahydroizochinoliny. Jen ve výjimečných případech jsou tyto benzyltetrahydroizochinoliny aromatické: jedním z příkladů je papaverin. Všechny tyto sloučeniny mají z biogenetických důvodů 6,7-disubstituované izochinolinové jádro a poloviční podíl mono-, di- nebo trisubstituovaného benzylu: nejběžnější deriváty jsou deriváty koklaurinového typu (12-monosubstituované) a typu retikulinu (11, 12- disubstituované). Protože jsou tyto benzyltetrahydroizochinoliny prekurzory všech dalších izochinolinových alkaloidů, objevují se prakticky ve všech rostlinách, které jsou schopné vytvářet komplexnější izochinolinové struktury.

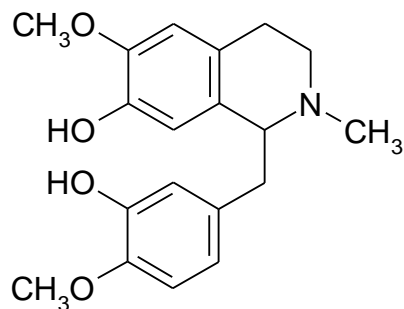
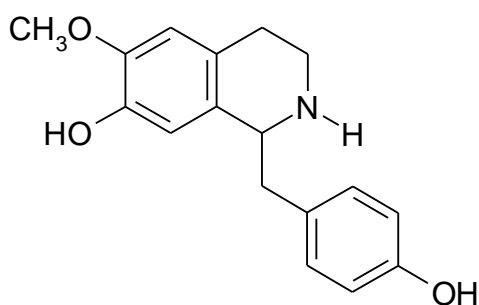
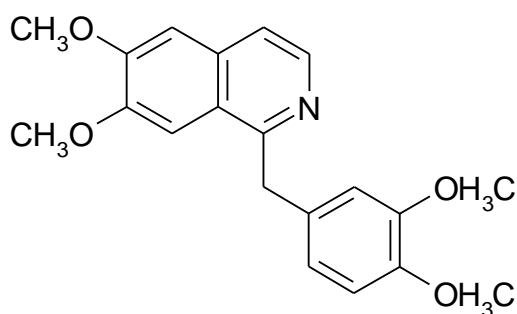
Některé z těchto sloučenin mají zajímavý farmakologický potenciál, například higenamin z rostlin *Annona squamosa* L (*anona šupinatá*) a *Aconitum japonicum* Thunb., (*oměj japonský*), který stimuluje činnost srdce.

Farmakologický účinek: Papaverin nemá prakticky žádný účinek na centrální nervový systém. Je to muskulotropní spasmolytikum, které uvolňuje vlákna hladkých svalů, zvláště krevních cév mozku, plic a systémových periferních cév, ale také hladké svalstvo průdušek, střev, dělohy a žlučovodu. Spasmolytická aktivita je výraznější v případě, že pacienti už měli dříve spasmus. Papaverin má však negativní účinek na srdeční sval: snižuje vodivost a excitabilitu, a zvyšuje průtok krve koronárními arteriemi. Jeho aktivita je spojena s jeho schopností inhibovat fosfodiesterázu, která hydrolyzuje cAMP a snížit nitrobuňčnou koncentraci kalcia (tím, že inhibuje jeho vstup do buňky nebo zvýší jeho absorpci retikulem).³

Použití

Navzdory tomu, že neexistuje shoda ohledně klinického přínosu papaverinu jako vazodilatátoru a antiischemika při léčbě nebo preventivní léčbě cévní mozkové ischemie, používá se stále poměrně hodně. Kromě toho, že je indikován jako relaxans hladkých svalů (čtyřprocentní injekční roztok) a k symptomatické léčbě bolesti při intermitentní klaudikaci, která je způsobená chronickým obliteračním onemocněním tepen dolních končetin také se používá

ke zlepšení určitých symptomů senilní demence (např. ztráta pozornosti a paměti) a k léčbě symptomů ischemie oka. Dále se používá při léčbě závratí u starších lidí a k léčbě následků cerebrovaskulárních příhod. Kontraindikace zahrnují zvýšený nitrolební tlak, parkinsonismus a poškození srdečního vodivého systému, ale papaverin není hypotenzní prostředek a má jen výjimečně vedlejší účinky (tachykardie, zácpa, transamináza, fosfatáza a bilirubinémie). Z důvodu již zmíněných indikací je papaverin někdy kombinován s jinými sloučeninami (např. s butalaminem). Tento alkaloid je také součástí kombinací, které se používají k léčbě fragility kapilár (např. kombinace s hesperidinem metylchalkonem, kyselinou askorbovou a etoxazorutinem). Jako spasmolytikum je součástí registrovaných léků, které se předepisují k zmírnění symptomů funkční kolopatie, zejména plynatosti a průjmu.³

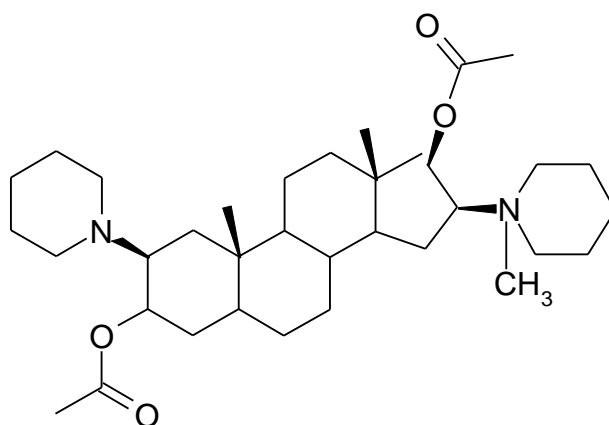
**retikulin³****koklaurin³****papaverin³**

2.2.1.2 Bisbenzyltetrahydroizochinoliny

Dimery bisbenzyltetrahydroizochinolinů a aporfin-benzyltetrahydroizochinolinů představují více než 400 sloučenin, které se objevují v asi 10 čeledích, hlavně v čeledi Menispermaceae (rod *Abuta*, *Albertisia*, *Cocculus*, *Stephania*, *Tiliacora*, celkem asi 25 rodů, Ranunculaceae (*Thalictrum*), Berberidaceae (*Berberis*, *Mahonia*), ale také Monimiaceae (*Daphnandra*), Annonaceae (*Phaeanthus*, *Popovia*, *Pseudoxandra*, *Uvaria*) nebo Lauraceae.³

Téměř všechny známé bisbenzyltetrahydroizochinoliny vznikají z intermolekulární oxidační kopulace dvou koklaurinových (nebo N-methylkoklaurinových) jednotek; jen v několika výjimečných případech, to jsou bisretikuliny (*Hernandia*).³

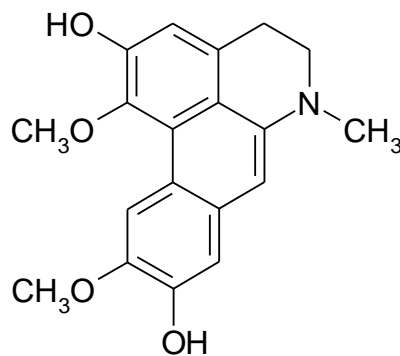
Farmakologicky je o tyto sloučeniny omezený zájem: ačkoli některé z nich mají zajímavý potenciál, žádná z nich se v současné době neobjevuje na trhu v Evropě. Tetrandrin má protinádorové vlastnosti (leukémie), cefarantin antituberkulózní účinek, pyknamin nebo nortiliakorin A mají antimalarické vlastnosti. Několik sloučenin v této skupině jsou hypotenzní prostředky (pendulin). Některé z nich mají podobný účinek jako kurare na zakončení motorických nervů, kvůli kterému jsou používány, i když preparáty, které jsou v současné době na trhu jsou polysyntetické nebo syntetické deriváty.³



vecuronium

2.2.1.3 Aporfinoidy

Velká skupina více než 500 alkaloidů (proaporfinů, aporfinů a jejich derivátů), aporfinoidů se objevuje často převážně u určitých zastaralých čeledí, včetně čeledi Annonaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Monimiaceae, Menispermaceae, Hernandiaceae a Ranunculaceae.³



dehydroboldin³

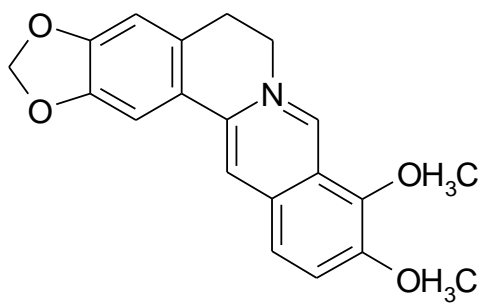
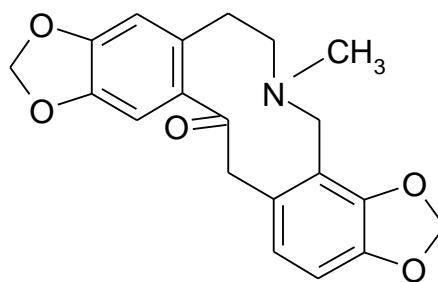
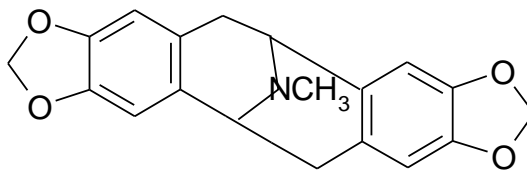
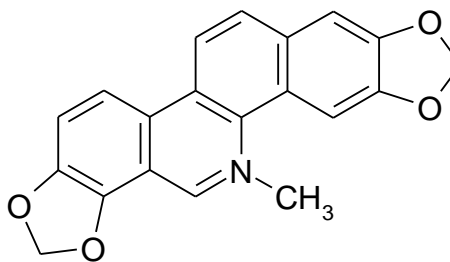
2.2.1.4 Protoberberiny a jejich deriváty

Protoberberiny jsou poměrně rozšířené kvartérní nebo terciární tetracyklické alkaloidy (terciárním tetracyklickým alkaloidům se také říká tetrahydroprotoberberiny), které se nacházejí v čeledích Berberidaceae, Menispermaceae, Ranunculaceae a také v čeledi Annonaceae nebo Papaveraceae. Jejich biogenetický potenciál je značný, zejména kvůli protopinům, které vznikají štěpením vazby mezi C-14 a atomem dusíků.

Protoberberiny podobně jako další izochinolinové alkaloidy vznikají z benzyltetrahydroizochinolinu: atom uhlíku C-8 vzniká z oxidační cyklizace N-metylové skupiny molekuly tohoto typu. Odborníci se domnívají, že do této cyklizace, která je katalyzována berberin bridge enzymem (BBE), je zapojen ion iminia (to se shoduje s oxidací N-metylové skupiny), což na základě jeho reakce s orto pozicí vztahující se k C-9 (to je orto nebo para vztahující se k volné fenolové skupině na prstenci C) vede k vytvoření 2,3,9,10-tetrasubstituovanému tetrahydroprotoberberinu nebo jeho (2,3,10,11-tetrasubstituovanému) pseudohomologu.

Některé z mnoha derivátů, které vznikají oxidací a přesmykem tetrahydroprotoberberinů mají zajímavé farmakologické vlastnosti. Například phthalidotetrahydroizochinoliny mají antitusické vlastnosti (narkotin = noskapiin) nebo jsou antagonistou gama-aminobutyrové kyseliny (bikukulin). Dalším příkladem jsou kvartérní benzofenanthridiny: protinádorové vlastnosti nitidinu a fagaroninu a inhibice virové reverzní transkriptázy stejnými sloučeninami, které se vážou na specifické páry bází. Tyto benzofenanthridiny reagují s biopolymery přes jejich iminiovou vazbu pomocí interkalace a na základě jejich kationtové povahy.

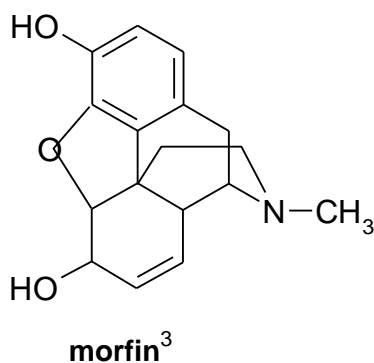
I když mnoho sloučenin v různých řadách odvozených z protoberberinů mají zajímavé farmakologické vlastnosti, do současné doby našla terapeutika využití jen pro několik z nich. Nicméně, určité množství skupin, které je obsahují jsou v současné době používány jako galenické přípravky nebo buď přímo nebo po jednoduché transformaci, jako fytofarmaceutika, které představují návrat k lidové medicíně: v obou případech však ještě nebyl zdaleka vztah mezi účinkem, který je tradičně připisován těmto lékům a alkaloidy, které obsahují prokázán.³

**berberin³****protopin³****eschscholzin³****sanguinarin³**

2.2.1.5 Morfinany

Na rozdíl od ostatních izochinolinových alkaloidů, které se objevují zejména často v čeledi Papaveraceae (*Argemone*, *Bocconia*, *Chelidonium*, *Eschscholzia*, *Glaucium*, *Meconopsis*, *Papaver*, *Roemeria* a další) morfinanové alkaloidy jsou specifické pro rod *Papaver*. musíme však zdůraznit, že z více než 100 druhů v tomto rodu komplexní taxonomie, jen asi 10 z nich biosyntetizuje tebain (*P. bracteatum* Lindl, *P. orientale* L a další) a že morfin je produkován jen *P. somniferum* a *P. setigerum* DC.

Co se týká struktury existují skutečné morfinanové alkaloidy, což jsou alkaloidy specifické pro rod *Papaver* a morfinandienony, které jsou o něco běžnější a jsou rozšířeny méně specificky, ale ne v širokém měřítku (čeledi Papaveraceae, Menispermaceae, Lauraceae, Euphorbiaceae).³

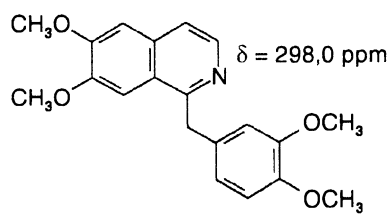
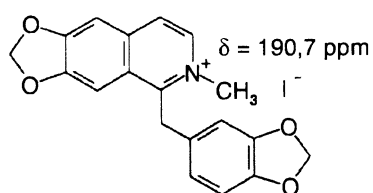
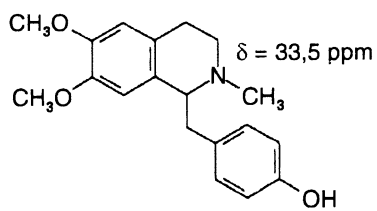


2.2.2 ^{15}N NMR studium isochinolinových alkaloidů¹⁷

Chemické posuny jádra dusíku ^{15}N jsou citlivým indikátorem strukturního uspořádání v organických a bioorganických sloučeninách¹⁸. Přímé měření parametrů jádra ^{15}N je u přírodních látek limitováno dostupným množstvím vzorku a poměrně nízkou NMR citlivostí. Tato omezení mohou být částečně překonána aplikací inverzních NMR experimentů¹⁹. Zavedení krátkých pulzních gradientů magnetického pole přineslo výrazné zlepšení kvality experimentů²⁰.

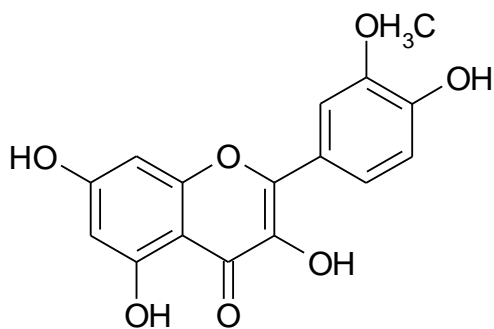
Ke studiu bylo vybráno 40 kvartérních a terciálních isochinolinových alkaloidů šesti konstitučních typů. Všechny sloučeniny byly izolovány z rostlin čeledi Papaveraceae a Fumariaceae. Studované alkaloidy lze zařadit k benzo[c]fenanthridinovému, protoberberinovému, benzyliisochinolinovému, aporfinovému, pavinanovému a β -karbolino-proaporfinovému typu. Protože dusíkový atom isochinolinových alkaloidů nenese přímo vázaný atom vodíku, měření parametrů ^{15}N je založeno na ^1H - ^{15}N interakcích dalekého dosahu ($^2J_{\text{H,N}}$ a $^3J_{\text{H,N}}$). Pro měření parametrů jádra dusíku ^{15}N byly použity GSQMBC²¹ (Gradient-Enhanced Single-Quantum Multiple Bond Correlation) a GHMBC²² (Gradient-Enhanced Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

V analogii k jiným typům organických molekul můžeme vyvodit některé závěry a pro demonstraci uvádíme tři příklady alkaloidů benzyliisochinolinového typu. Dusíkový atom studovaných isochinolinových alkaloidů je silně odstíněn, pokud jeho volný elektronový pár může být delokalizován v přilehlém π systému nebo je přímo součástí tohoto nenasyceného systému. U dusíků pyridinového typu je odstínění spojeno s přítomností nízkých $n \rightarrow \pi^*$ elektronových stavů (papaverin (I) $\delta \sim 300$ ppm). Methylace isochinolinového dusíku vytváří na tomto atomu kladný náboj, avšak vznikající pozitivní náboj pouze částečně kompenzuje odstranění odstíňujícího příspěvku volného elektronového páru. Dusíkový atom vznikajícího methylisochinolinového iontu má potom chemický posun $\delta \sim 190$ ppm (escholamin jodid (II)). Dihydroisochinolinový a tetrahydroisochinolinový terciální dusíkový atom je podstatně zastíněn vzhledem k předcházejícím případům a jeho chemický posun se pohybuje v rozmezí 21 – 63 ppm pro studované sloučeniny (armepavin (III.) $\delta \sim 33$ ppm).

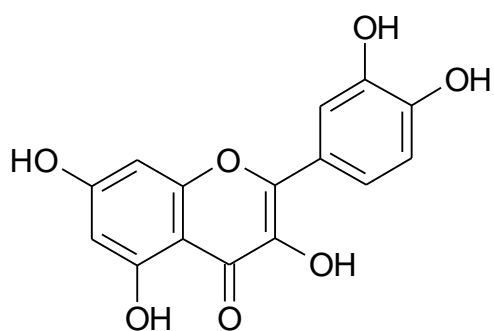
Papaverin, *I*Escholamin jodid, *II*Armepavin, *III*

2.2.3 Flavonoidy

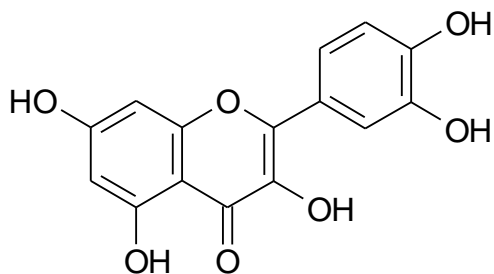
obsahové flavonoidy (standards)



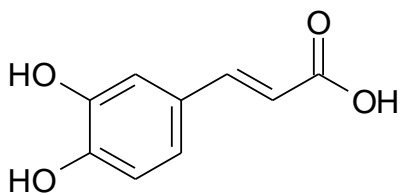
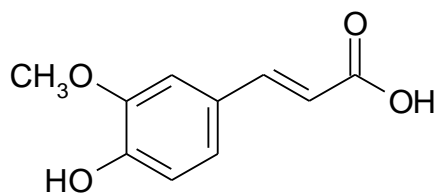
rutin¹⁴



kvercetin¹⁶



isorhamnetin¹⁶

další použité standardy flavonoidů**kyselina kávová****kyselina ferulová**

poznámka: Sigma – výrobce standardů

2.3 Biologická účinnost a klinické použití popsané v literatuře

Biologická účinnost a nejvýznamnější klinické použití *Eschscholzia californica* popsané v literatuře jsou:²³

Hypnotický a anxiolytický účinek

Eschscholzia californica se používá buď samostatně nebo společně s jinými léčivými rostlinami (mučenka, kozlík lékařský, citrónový balzám) při léčbě úzkostí a k navozování spánku u pacientů trpících nespavostí.¹

Mechanismus účinku *Eschscholzia californica* není stále ještě jasný. Při pokusech má sluncovka sedativní účinek na centrální nervový systém a relaxační účinek na hladké svalstvo ilea².

Sloučeniny přítomné ve vodném alkoholickém extraktu z *Eschscholzia californica* inhibují enzymatickou degradaci a neosyntézu katecholaminů. Extrakt *Eschscholzia californica* inhibuje jak dopamin- β -hydroxylázu tak monoaminoxidázu typu B a to může vysvětlit část jeho sedativního účinku a spánek navozujícího účinku.³

Analgetický a antispastický účinek

Navíc je známo, že enkefaliny a neuromodulátory polypeptidů zapojené do humorální regulace a nocicepce jsou inaktivovány prostřednictvím peroxidace a dimerizace. Bylo prokázáno, že sluncovka inhibuje tento typ inaktivace, tudíž prodlužuje působení enkefalinů. Je možné, že část účinku *Eschscholzia californica* na centrální nervový systém je způsobená tímto mechanismem.⁴ Analogie mezi alkaloidy v *Eschscholzia californica* a alkaloidy v *Papaverum somniferum* vedla vždycky k domněnce o podobném účinku obou skupin aktivních látek. Někteří autoři zastávají názor, že izochinolinové alkaloidy působí na centrální nervový systém tím, že navozují spánek a na periferní nervový systém tím, že snižují tonus hladkého svalstva, zvláště hladkého svalstva střev. Z tohoto důvodu je sluncovka rostlina se sedativními, analgetickými a antispastickými účinky, ale nezdá se, na rozdíl od alkaloidů máku setého, že alkaloidy v *Eschscholzia californica* vyvolávají toleranci a

závislost. Celkově je účinek sluncovky stejný jako u běžných bylin, které mají sedativní účinek a nejsou nakrotické.

Tato rostlina se může také používat u onemocnění, která jsou charakterizována spasmy hladkých svalů, u některých typů astmatu, u bolestivých spasmů gastrointestinálního traktu a zvláště u některých forem dráždivého tračníku, spastické kolitidy a při funkčních poruchách gastrointestinálního traktu a psychosomatických bolestech břicha.

Anticefalalgický účinek

Eschscholzia californica se tradičně používá při léčbě některých forem bolestí hlavy. Protože enkefaliny jsou zapojeny do vyvolávání dráhy pocitu bolesti, která vychází z periferních nociceptivních zakončení, látka, která zpomaluje inaktivaci a tím prodlužuje účinek enkefalinů, obvykle jedná jako analgetikum. Tento mechanismus způsobuje, že *Eschscholzia californica* je účinná v případě vazomotorické cefalalgie. Měli bychom také zmínit to, že vazomotorická cefalalgie má multifaktoriální patogenezi a jedním z faktorů je i úzkost, proto je terapeutická účinnost sluncovky větší.

¹“Bylinný lék Phytonoxon N (zkratka PN) je indikován u nespavosti vyvolané nervozitou, při stavech vzrušení a/nebo u úzkostí. Skládá se z alkoholických extraktů drog rostlin *Corydalis cava* (dymnivky duté) (20%) a *Eschscholzia californica* (80%). Obě rostliny jsou bohaté na izochinolinové alkaloidy odvozené z metabolismu tyrosinu. Nedávný výzkum ukazuje, že tyto rostliny mohou ovlivnit metabolismus neurotransmiterů“

² Farmakologické účinky *Eschscholzia californica* Cham. nejsou ještě dobře známy. Cílem této práce je ověření jejich farmakologických vlastností a první seznámení s jejími aktivními látkami. (Vincieri FF, Celli S, Mulinacci N, Speroni E. Pharmaceutical Sciences Department, Florencie, Itálie. An approach to the study of the biological activity of *Eschscholzia californica* Cham. (První pokus studovat biologický účinek *Eschscholzia californica* Cham.). Pharmacol Res Comm 1988; 20 (Suppl 5): 41-4).

³“Vodné alkoholické extrakty z *Eschscholzia californica* inhibují enzymatickou degradaci katecholaminů a rovněž syntézu adrenalinu... Dopamin β -hydroxyláza a monoaminoxidáza (MAO-B) jsou zvláště inhibovány extrakty z *Eschscholzia*. Diaminoxidázy jsou inhibovány

v podobné míře“ (Kleber E, Schneider W, Schafer HL, Elstner EF. *Organon International BV, Oberschleissheim, Německo. Modulation of key reactions of the catecholamine metabolism by extracts from Eschscholtzia californica and Corydalis cava. (Modulace klíčových reakcí metabolismu katecholaminů extraktem z Eschscholtzia californica a Corydalis cava). Arzneimittel.Forschung Drug Research 1995; 45: 127-31).*

⁴Endogenní pentapeptidy, metenkefalin a leukenkefalin, které jsou podobné své výchozí, původní struktuře, β -endorfinu nebo dynorfinu, se váží na opioidní receptory nociceptivního systému tudíž vyvolávají analgetickou odezvu. Bylo prokázáno, že peroxidázy a fenolázy (tyrosináza, katecholáza) tyto pentapeptidy dimerizují, tudíž pravděpodobně zmírňují jejich účinek a/nebo zkracují jejich dobu existence... Výsledky studie ukazují, že dimerizace katalyzovaná peroxidázou přes zbytky tyrosinu je zvláště inhibována extraktem z *C. cava* a *Eschscholtzia californica* (Papaveraceae). Na základě reakce katalyzované tyrosinázou vznikne pět rozdílných produktů A-E, podle jejich doby zadržetí HPLC. Phytonoxon N (zkráceně PN), který se skládá z kombinace extraktu z *E. californica* a *C. cava* v poměru 4:1 (v/v), stimuluje tvorbu vedlejších produktů A,B a E, zatímco tvorba hlavních produktů C a D je inhibována. Jenom produkty C a D mají vlastnosti podobné diméru, který je odvozený peroxidázou. Je pravděpodobné, že produkt A je identický s DOPA-enkefalinem. (Reimeier C, Schneider I, Schneider W, Schafer HL, Elstner EF. *Steiferwald Arzneimittelwerk GmbH, Darmstadt, Německo. Effects of ethanolic extracts from Eschscholtzia californica and Corydalis cava on dimerization and oxidation of enkephalins. (Účinky etanolického extraktu z Eschscholtzia californica a Corydalis cava na dimerizaci a oxidaci enkefalinů)* *Arzneimittel-Forschung Drug Research 1995; 45: 132-6).*

Další účinky

Sanguinarin, jeden z hlavních alkaloidů obsažených v *Eschscholtzia californica*, má také antibakteriální⁵, cytotoxický a protizánětlivý účinek, a běžně se používá proti bakteriálnímu plaku v zubních pastách a ústních vodách. Sanguinarin má také pozitivní inotropní účinek a inhibuje mnoho enzymů (ATPázu, diaminoxidázu, aminotransferázu).⁶

Tolerance: Sluncovka je léčivá rostlina, která je dobře organismem snášena a nemá výraznější vedlejší účinky. Je často předepisována jako fytoterapeutický preparát a jako lék při poruchách spánku u dětí.⁷ Neexistují žádné známé kontrolované klinické studie týkající se těhotných nebo kojících žen; nicméně někteří autoři uvádějí, že některé složky rostliny mají relaxační účinek na

izolovanou dělohu morčat.⁸ Tento lék by se však měl užívat během těhotenství a kojení jen v případech opravdové nutnosti.

⁵„Rostlina se brání proti mikrobiálním patogenům a býložravcům indukcí obranných proteinů a antibiotik s nízkomolekulární hmotností... Stimulátorem plísní (hub) (methyl-jasmonátem a jeho prekurzorem 12-oxofytodienovou kyselinou odvozenou od kyseliny linoleové) byla v podobné kvalitativní a kvantitativní míře vyvolána indukce specifických enzymů v dráze benzo[c]fenanthridinových alkaloidů, která vedla k vzniku antimikrobiálního sanguinarinu. Domníváme, že u rostlin může existovat druhá oxolipidová kaskáda počínaje kyselinou linolovou přes 15, 16 dihydro-12-oxofytodienovou kyselinu až po 9, 10-dihydrojasmonát. Pokusy se syntetickým trihomojasmonátem prokázaly, že β -oxidace není nezbytným předpokladem pro biologický účinek a že 12-oxofytodienová kyselina a její deriváty jsou pravděpodobně plně aktivní jako přenašeči signálu. Sloučeniny odvozené od kyseliny oktadekanové jsou zásadními prvky při modulaci syntézy antibiotik a jsou tudíž nedílnou součástí obranného mechanismu rostlin“. (Blechert S, Brodschelm W, Holder S, Kammerer L, Kuchta T M, Mueller MJ, Xia ZQ, Zenk MH. Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität München, Německo. *The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways*. (Dráha (reakce) kyseliny oktadekanové: signální molekuly pro regulaci sekundární dráhy (reakce)). *Proc Nat Acad Sci USA*. 1995; 92: 4099-105).

⁶Harborne JB, Barter H. *Phytochemical Dictionary*. (Fytochemický slovník) Taylor & Francis, Londýn, 1993, pag. 219.

⁷Vincieri FF, Celli S, Mulinacci N, Speroni E. *An approach to the study of the biological activity of Eschscholtzia californica*. (První pokus studovat biologický účinek *Eschscholtzia californica*). *Pharmacol. Res. Comm.*, 1988; 20 (Suppl. 5): 41-44

⁸*Adverse Effects of Herbal Drugs*. (Nepříznivé účinky bylinných léků.) De Smet PAGM (Ed.) Springer – Verlag, Berlin 1993, p. 41.

Akutní toxicita: Extrakty v horké vodě nevykázaly na myších, při jednorázovém podání až 8g/kg, žádné toxické efekty.²⁴

2.4 Dvojitě zaslepená, randomizovaná, placebo kontrolovaná studie hodnotící účinnost a bezpečnost přesně stanoveného množství kombinace extraktů z rostlin *Crataegus oxyacantha* a *Eschscholzia californica* a magnesia u mírných a středně mírných úzkostí²⁵

Michel Hanus¹, Jacqueline Lafon² a Marc Mathieu²

¹Psychiatr, Paříž, Francie

²Innothera Laboratories, Arcueil, Francie

Klíčová slova: úzkostné poruchy – klinický pokus – *Crataegus oxyacantha* – *Eschscholzia californica* – praxe praktického lékaře – magnesium

SOUHRN

Cíl: Zhodnotit klinickou účinnost neurotonické složky obsahující přesně stanovené množství dvou rostlinných extraktů *Crataegus oxyacantha* a *Eschscholzia californica* a magnesium v porovnání s placebem při léčbě mírných a středně mírných úzkostí, které jsou spojené s funkčními poruchami za běžných podmínek předepisování léků v praxi praktického lékaře.

Postup a metody výzkumu: Celkem 264 pacientů (81% žen; průměrný věk: 44,6 let), kteří navštívili lékaře z důvodu generalizované úzkosti (DSM-III-R - The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) mírné a středně mírné intensity (celkové skóre úzkosti na Hamiltonově stupnici mezi 16 a 28) bylo zařazeno do dvojitě zaslepené, randomizované, placebo kontrolované studie. Pacienti byli náhodně rozděleni do dvou skupin: 130 z nich byl podáván testovaný lék (Sympathyl*) a 134 pacientů dostávalo placebo (2 tabletky 2x denně po dobu 3 měsíců). Údaje o účinnosti a bezpečnosti byly zaznamenány před zahájením studie a 7, 14, 30, 60 a 90 dní po zahájení léčby.

Hodnocení: účinnost byla hodnocena na základě (a) změny v celkovém a somatickém skóre úzkosti na Hamiltonově stupnici ; (b) toho jak pacienti hodnotili své pocity úzkosti; (c) počtu a procenta pacientů vnímavých k léčbě (alespoň 50-procentní snížení u skóre na Hamiltonově stupnici úzkosti nebo skóre získaného na základě vlastního hodnocení pocitů úzkosti pacienty) a (d) celkového klinického dojmu lékaře. Tolerance byla hodnocena podle vedlejších účinků testovaného léku, které pacienti hlásili během studie.

Výsledky: během léčby došlo ke snížení celkového a somatického skóre úzkosti na Hamiltonově stupnici a skóre na vizuální analogové stupnici, což bylo příznakem klinického zlepšení. Snížení bylo větší u pacientů, kteří užívali testovaný lék než v placebo skupině. Konec klinického zlepšení na základě měření průměrného rozdílu mezi konečným skóre a skóre před léčbou, byl pro pacienty, kteří užívali testovaný lék a placebo skupinu -10.6 a - 8.9 u celkového skóre úzkosti na Hamiltonově stupnici ($p=0.005$); - 6.5 a -5.7 u somatickém skóre úzkosti na Hamiltonově stupnici ($p= 0.054$); a -38.5 a -29.2 pro pocity úzkosti hodnocené pacienty ($p=0.005$). Poměr riziko/přínos na základě hodnocení lékařů, kteří prováděli studii byl také značně větší u pacientů, kteří užívali testovaný lék než u placebo skupiny. Celkem 15 pacientů (11,5%), kteří užívali testovaný lék a 13 pacientů (9,7 %) v placebo skupině mělo 22 a 15 různých zdravotních somatických potíží (nežádoucích příhod). Zdravotní somatické potíže (nežádoucí příhody) byly hlavně mírné nebo středně mírné poruchy zažívání nebo psychopatologické poruchy.

Závěr: Bylo prokázáno, že preparát obsahující přesně stanovené množství *Crataegus oxyacantha*, *Eschscholzia californica* a magnesium je bezpečný a účinnější než placebo při léčbě mírných a středně mírných úzkostných poruch.

*Sympathyl je vyráběn a byl uveden na trh farmaceutickou firmou Laboratoire Innotech International, Arcueil, Francie

2.4.1 Úvod

Návštěvy pacientů u praktického lékaře z důvodu úzkostných poruch jsou hodně časté: úzkostnými poruchami trpí 25% dospělých francouzů, toto číslo zahrnuje i 9% pacientů, kteří trpí generalizovanou úzkostí¹. Praktičtí lékaři běžně předepisují těmto pacientům anxiolytika nebo hypnotika – obvykle některý druh benzodiazepinů. 25% až 30 % dospělých francouzů tedy užívá občas nebo pravidelně benzodiazepiny a asi 5-7% z nich více než 12 měsíců². Benzodiazepiny a jiné anxiolytické léky by však měly být předepisovány jen velmi opatrně, protože tak rozšířené předepisování těchto léků není vždy oprávněné s ohledem na správnou lékařskou praxi a jejich užívání není také bez rizika^{3,4}. V krátkodobém horizontu, mají benzodiazepiny sedativní účinek a způsobují ztrátu paměti. Jsou tedy příčinou toho, že se zvyšuje počet pacientů přijímaných do nemocnice, protože tyto léky narušují rovnováhu u starších lidí a snižují pozornost u řidičů⁵. V dlouhodobém horizontu mohou benzodiazepiny vést k závislosti s abstinenčním syndromem u asi jedné třetiny pacientů už po 4 až 6 týdnech pravidelného užívání⁵⁻⁷. Jiná anxiolytika, jako venlafaxin LP, buspiron a hydroxyzin jsou méně návykové, ale mají značné vedlejší účinky (somnolence, únava, gastrointestinální poruchy a závratě), které někdy vyžadují předčasné ukončení léčby⁸.

Jako alternativní symptomatická léčba při stavech úzkosti, které nejsou příliš závažné může být fytoterapie s anxiolytiky a/nebo sedativy. Proto tedy ve svých doporučeních, která se týkají ambulantní léčby úzkostných poruch u dospělých, agentura ANAES (Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé) cituje Bourina a jiné⁹, a podporuje ve shodě s nimi užívání fytoterapeutického preparátu, Euphytose*, který je založen na suchém extraktu z následujících rostlin *Crataegus*, *Balloia*, *Passiflora*, *Valeriana*, *Cola* a *Paullinia* (hlohu, balloie, mučenky, kozlíku, koly a paulonie). Tento preparát byl uveden na francouzský trh jako terapeutický prostředek pro léčbu neurotonických stavů a zejména mírných poruch spánku.

Preparát, který obsahuje přesně stanovené množství dvou rostlinných extraktů (*Crataegus oxyacantha* a *Eschscholzia californica*) a magnesium se v současné době používá ve Francii jako fytoterapeutický lék (SympathyI⁺). Tento lék je předepisován u dospělých k léčbě úzkostných stavů spojených

s neurotonickou poruchou, k léčbě mírných poruch spánku nebo srdeční vzrušivosti, v dávce dvě tablety 2x denně. Pro jeho účinnost svědčí skutečnost, že složky tohoto preparátu se už tradičně používají při léčbě úzkostných poruch a jejich somatických projevů. *Crataegus oxyacantha* má spasmolytické a anxiolytické vlastnosti¹⁰. *Eschscholzia californica* má spasmolytické, anxiolytické a sedativní vlastnosti¹¹ a je dobře známo, že nedostatek magnesia může způsobit somatické a psychické poruchy¹². Pokud však víme, žádná studie ještě opravdu neprokázala jejich klinickou účinnost při léčbě úzkostných poruch.

Náš článek uvádí výsledky klinické studie prováděné za běžných podmínek předepisování léků praktickým lékařem. Cílem studie bylo zhodnotit účinnost tohoto preparátu při léčbě mírných a středně mírných úzkostí spojených s funkčními poruchami.

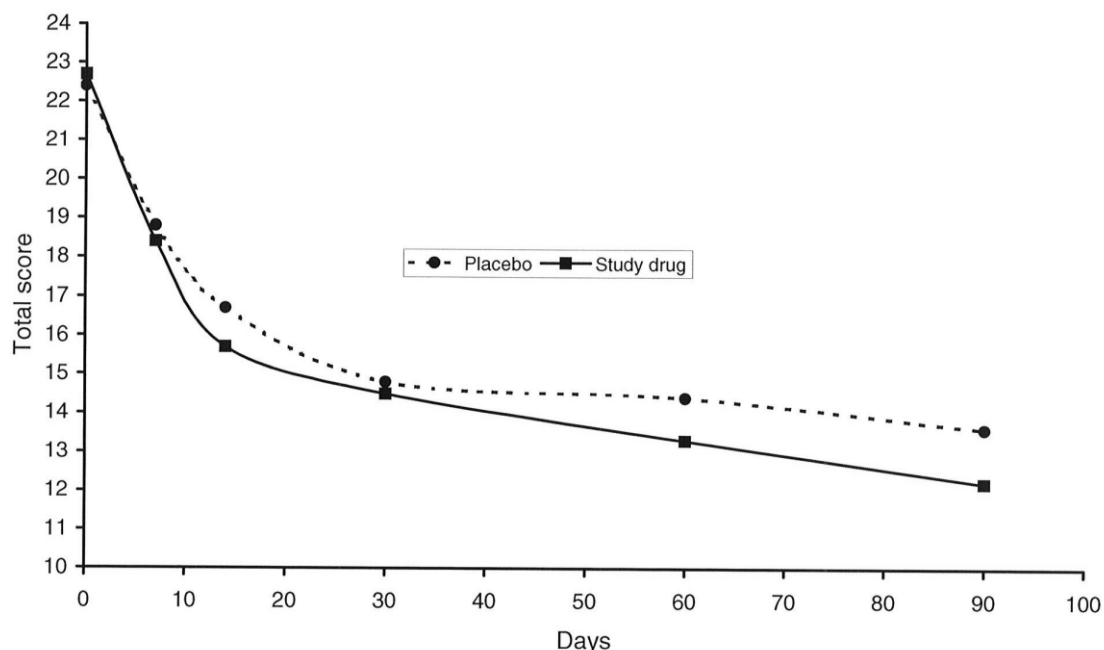
*Euphytose je registrovaný obchodní název Roche Nocholas SA, Gaillard, Francie

2.4.2 Výsledky

Tabulka č.1 Demografická a klinická charakteristika obou léčených skupin před zahájením studie (D0). Srovnání provedené mezi oběma léčenými skupinami.

Parametry	skupina, která užívala testovaný lék n = 130	placebo skupina n = 134	p hodnota
ženy/muži	105/25	109/25	0,905*
věk: průměrný [minimální, maximální]	44,8 [19;81]	44,5 [18;82]	0,989†
doba trvání úzkosti (měsíce): průměrná [minimální, maximální]	90 [6; 720]	83 [6;480]	0,734‡
týdenní frekvence záchvatů, průměrná [minimální, maximální]	5,9 [4;7]	5,9 [4;10]	0,911†
počet přítomných symptomů: průměrný [minimální, maximální]	11,8 [7;18]	11,7 [6;18]	0,936†
Hamiltonova stupnice úzkosti: průměr [minimum, maximum]			
celkem	22,7 [18;28]	22,4 [18;28]	0,343†
somatické skóre	13,3 [9;19]	13,2 [6;18]	0,902†
psychické skóre	9,5 [4;14]	9,2 [6;16]	0,244†
hodnocení pocitů úzkosti pacienty (VAS od 0 do 100 mm)	73,2 [37;98]	72,9 25;99]	0,855†
Testovaný lék: preparát ve formě tabletek obsahující přesně stanovené množství dvou rostlinných extraktů (Crataegus oxyacantha a Eschscholzia californica) a magnesium; placebo: tabletky identického vzhledu. * χ^2 test; † analýza variance; ‡ Kruskal-Wallisův test			

Graf č.1 Průběh změn celkového skóre úzkosti během léčby na Hamiltonově stupnici



Demografická a klinická charakteristika pacientů

Pacienti, kteří byli zařazeni do studie byly převážně ženy (81%), jejich průměrný věk byl 44,6 let. Úzkostí trpěli v průměru 86 měsíců. Měli čtyři až deset záchvatů týdně. Jejich generalizovaná úzkost zahrnovala šest až osmnáct symptomů; tyto symptomy byly převážně únava (233 pacientů), napětí, bolest a bolest svalů (215 pacientů), bušení srdce nebo tachykardie (214 pacientů), podrážděnost (211 pacientů), potíže při usínání nebo přerušovaný spánek (209 pacientů), pocity nadměrného vzrušení nebo vyčerpání (207 pacientů). Celkové skóre úzkosti na Hamiltonově stupnici bylo mezi 18 a 28, což bylo příznakem středně mírné úzkosti. U obou skupin byly porovnány všechny studované parametry a zejména jejich počáteční skóre úzkosti na Hamiltonově stupnici (viz. tabulka č. 1).

Dodržování léčby pacienty bylo celkově dobré. Průměrná doba trvání léčby byla 85 dní. Jen 31 pacientů ukončilo studii předčasně, hlavně z důvodů neúčinnosti léčby (šest pacientů ve skupině, která užívala testovaný lék a osm pacientů ve skupině, která dostávala placebo) nebo z důvodů různých zdravotních potíží (nežádoucích příhod) (tři pacienti v každé skupině).

2.4.3 Účinnost

Průběžné změny v celkovém a somatickém skóre úzkosti na Hamiltonově stupnici jsou znázorněny na grafu č. 1 a 2. U obou skupin se celkové a somatické skóre snížilo, což bylo příznakem klinického zlepšení. Snížení však bylo větší ve skupině pacientů, která užívala testovaný lék než ve skupině, která dostávala placebo. Od druhého týdne léčby se objevily značné rozdíly mezi oběma skupinami ve skóre od D0 (tabulka č. 2). Rozdíl mezi konečným bodem a celkovým skóre (D0) byl značně nižší ($p=0.005$) u pacientů, kteří dostávali placebo než u pacientů, kteří užívali testovaný lék. Naproti tomu, u somatického skóre, byla p hodnota, při 0.054, blízko prahu významnosti, ale nebyla důkazem žádných významných rozdílů mezi oběma léčenými skupinami.

Graf č. 3 ukazuje na vizuální analogové stupnici průběžné změny v intenzitě úzkosti, které vnímali pacienti. U obou skupin, se skóre snížilo, což bylo příznakem toho, že pacienti cítili menší úzkost v průběhu léčby než předtím, ale tento pokles byl větší u skupiny, která užívala testovaný lék než u skupiny, která dostávala placebo. Analýza variance týkající se změn v intenzitě úzkosti od D0 odhalila statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami ($p=0.013$), který byl ve prospěch skupiny pacientů, která užívala testovaný lék. Tento statisticky významný rozdíl ($p=0.005$) byl potvrzen i analýzou konečného bodu. Ve skupině pacientů, kteří užívali testovaný lék bylo výsledné skóre na vizuální analogové stupnici nižší o v průměru 38.5 mm ve srovnání se skupinou, která dostávala placebo, kde to bylo o v průměru 29.2 mm.

Ať se jednalo o jakékoli parametry (celkové, somatické skóre úzkosti na Hamiltonově stupnici nebo skóre na vizuální analogové stupnici), procento pacientů, u kterých měla léčba pozitivní účinek bylo vždycky značně větší ve skupině, která užívala testovaný lék, než ve skupině, která dostávala placebo. (tabulka č. 3).

Také lékaři, kteří studii prováděli se na konci studie vyjádřili ve prospěch testovaného léku: přínos byl posouzen jako větší než riziko u 90% pacientů ve skupině, která užívala testovaný lék v porovnání s 80% pacientů léčených placebem ($p=0.018$).

2.4.4 Bezpečnost

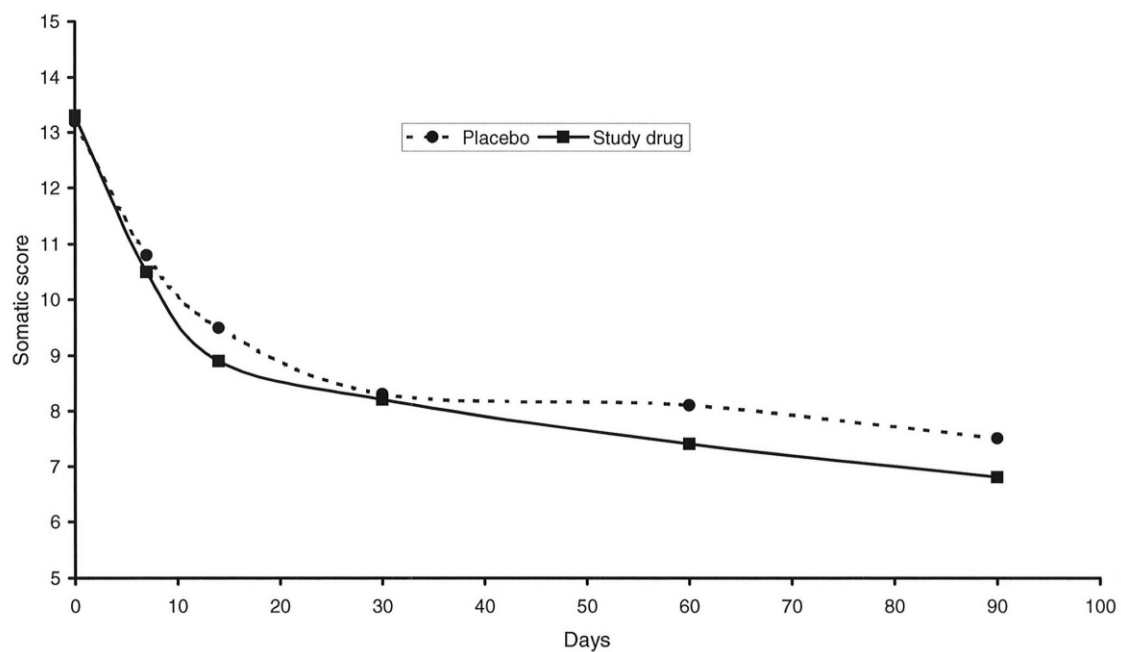
Procento pacientů, u kterých se objevil alespoň jeden druh nějakých zdravotních potíží (nežádoucích příhod) se nelišilo významně ve skupině pacientů, která užívala testovaný lék a ve skupině, která dostávala placebo (15 pacientů (11,5%) léčených testovaným lékem a 13 pacientů (9,7%), kteří dostávali placebo; χ^2 test: $p=0.628$).

Celkem bylo v průběhu studie zaznamenáno 37 různých zdravotních potíží (nežádoucích příhod) (15 u skupiny, které bylo podáváno placebo a 22 ve skupině, která užívala testovaný lék) (tabulka č. 4)

Z těchto 37 různých zdravotních potíží (nežádoucích příhod) pokládali 28 (10 ve skupině, která dostávala placebo a 18 ve skupině, které byl podáván testovaný lék) lékaři, kteří prováděli studii, za nepříznivé účinky, které pravděpodobně souvisely s podáváním testovaného léku nebo placeba..

Tyto zdravotní potíže (nežádoucí příhody) byly převážně zažívací potíže (devět různých zažívacích potíží u sedmi pacientů, kteří dostávali testovaný lék a šest různých zažívacích potíží u pěti pacientů v placebo skupině) nebo psychické potíže (čtyři různé psychické potíže u čtyř pacientů ve skupině, která dostávala testovaný lék a tři různé psychické potíže u tří pacientů v placebo skupině). Ve skupině, která užívala testovaný lék se vyskytly čtyři případy nevolnosti (jeden z nich byl tak závažný, že musela být léčba ukončena), ve skupině, která dostávala placebo žádné takové případy hlášeny nebyly. Ve skupině, která dostávala testovaný lék byly také hlášeny tři případy zpomalených reakcí pacientů po ránu, zatímco v placebo skupině žádné takové případy hlášeny nebyly. (tabulka č. 4).

graf č.2. Průběh změn somatického skóre úzkosti během léčby na Hamiltonově stupnici

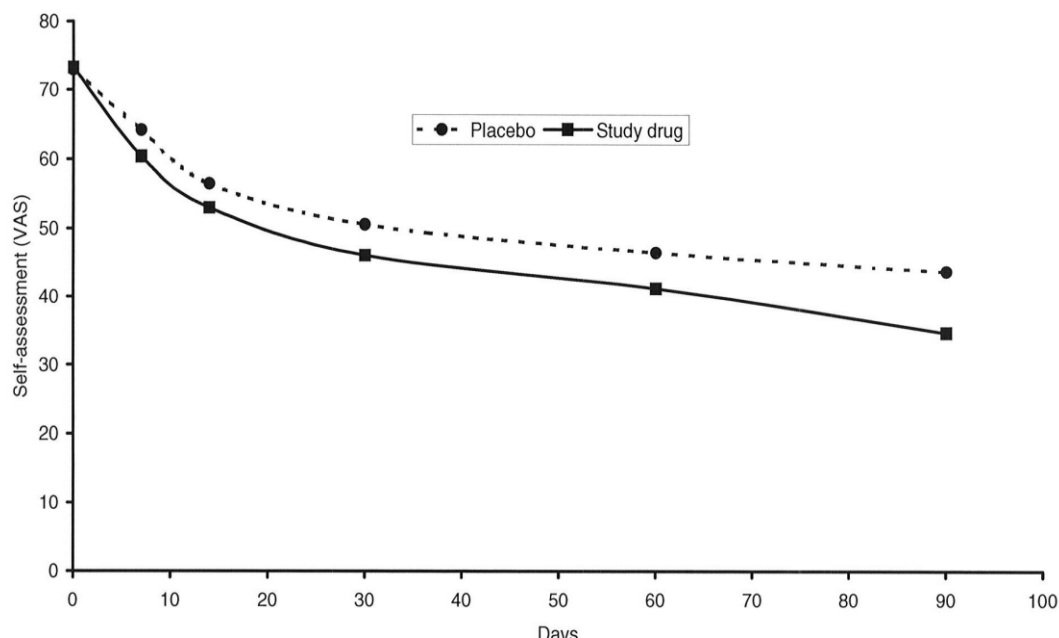


Tabulka č.2 Účinnost léčby na základě celkového a somatického skóre úzkosti na Hamiltonově stupnici. Rozdíl mezi skóre v obou skupinách před zahájením léčby a každý den hodnocení (s LOCF – last observation carried forward (psychiatric clinical research)). Srovnání provedené mezi oběma léčenými skupinami.

Hamiltonova stupnice: celkové skóre úzkosti*				Hamiltonova stupnice: somatické skóre úzkosti*		
	skupina, která užívala placebo skupina			skupina, která užívala placebo skupina		
	testovaný lék		p-hodnota†	testovaný lék		p-hodnota†
D7	- 4,3 ± 0,9	-3,6±0,8	0,219 (NS)	- 2,7 ± 0,5	- 2,3 ± 0,5	0,349 (NS)
D14	- 7,0 ± 1,0	- 5,7±1,0	0,016 (S)	- 4,4 ± 0,6	- 3,7 ± 0,6	0,028 (S)
D30	- 8,3 ± 1,0	- 7,6±1,1	0,259 (NS)	- 5,1 ± 0,6	- 4,9 ± 0,7	0,584 (NS)
D60	- 9,5 ± 1,1	- 8,0±1,1	0,015 (S)	- 5,9 ± 0,7	- 5,1 ± 0,7	0,063 (S)
D90	- 10,6 ± 1,2	- 8,9±1,2	0,005 (S)	- 6,5 ± 0,7	- 5,7 ± 0,7	0,054 (S)

Testovaný lék: preparát ve formě tabletek, obsahující přesně stanovené množství dvou rostlinných extraktů (*Crataegus oxyacantha* a *Eschscholzia californica*) a magnesium; placebo: tabletky identického vzhledu. *Průměr ± 2 standardní odchylka od průměru; †dvoufaktorová analýza variance (léčba a centrum); S: rozdíl mezi oběma skupinami je významný; NS: rozdíl mezi oběma skupinami není významný.

Graf č.3 Subjektivní hodnocení úrovně úzkosti během léčby na vizuální analogové stupnici



Tabulka č.3 Počet a procento pacientů s pozitivní reakcí na léčbu (pokles v úzkosti vyjádřený snížením o nejméně 50% ve skóre v porovnání s D0) při posledním hodnocení. Srovnání provedené mezi oběma léčenými skupinami.

Parametry	testovaný lék n=130	placebo n=134	p-hodnota*
Hamiltonova stupnice: celkové skóre úzkosti	59 (45%)	43 (32%)	0,017 (S)
Hamiltonova stupnice: somatické skóre úzkosti	67 (52%)	52 (39%)	0,019 (S)
hodnocení pocitů úzkosti pacienty (VAS od 0 do 100 mm)	76 (58%)	57 (43%)	0,008 (S)
Testovaný lék: preparát ve formě tabletek obsahující přesně stanovené množství dvou rostlinných extraktů (<i>Crataegus axycantha</i> a <i>Eschscholzia californica</i>) a magnesium; placebo: tabletky identického vzhledu. (a): dvoufaktorová analýza variance (centrum a léčba). S: rozdíl mezi oběma skupinami je významný.			

Všechny kromě tří zdravotních potíží (nežádoucích příhod) ve skupině, která dostávala testovaný lék byly mírné nebo středně mírné povahy. Tři druhy závažnějších zdravotních potíží byly jeden případ svalové ztuhlosti, jeden případ nespavosti a jeden případ nevolnosti. Tyto zdravotní potíže vedly k předčasnému ukončení léčby.

Šest pacientů (tři v každé skupině) předčasně ukončili studii kvůli různým zdravotním potížím (nežádoucím příhodám). V placebo skupině byly tři zdravotní potíže (nežádoucí příhody), které vedly k předčasnému ukončení léčby jeden případ rozsáhlého pruritu u pacienta, který strávil delší dobu na sluníčku, jeden případ zácpy a bolestí břicha u pacienta, který trpěl syndromem dráždivých střev a jeden případ bezděčných svalových kontrakcí. Ve skupině, která užívala testovaný lék se objevil jeden případ záchvatu paniky u pacienta, který měl stres v rodině a práci, jeden případ silné nevolnosti a jeden případ palpitace srdce.

V průběhu studie se objevily dvě vážné zdravotní komplikace. Pacient v placebo skupině, který trpěl syndromem dráždivých střev, a který navštívil lékaře protože trpěl zácpou a bolestí břicha byl hospitalizován (syndrom odezněl 12 hodin po vyprázdnění střev) a jeden pacient ze skupiny, která užívala testovaný lék byl hospitalizován z důvodu apendektomie. Ani jednu z těchto závažných zdravotních komplikací nepovažovali lékaři, kteří prováděli studii, za vedlejší účinek testovaného léku nebo placebo.

Tabulka č. 4 Počet nežádoucích příhod v obou léčených skupinách

Parametry		testovaný lék n=130	placebo n=134
Počet nežádoucích příhod		22	15
kožní defekty	svědění	0	1
poruchy činnosti nervového systému	bolesti hlavy	1	0
	svalová ztuhlost	1	0
	bezděčné svalové kontrakce	0	2
vestibulární a kochleární poruchy	bolest ucha	0	1
psychopatologické poruchy	nespavost	1	1
	ospalost	1	1
	apatie	1	1
	úzkost	1	0
srdeční poruchy	bušení srdce	1	0
gastrointestinální poruchy	bolest břicha	0	1
	nevolnost	4	0
	gastralgie	1	2
	průjem	2	2
	dyspepsie	1	0
	sucho v ústech	0	1
	apendicitida	1	0
urinární poruchy	dysurie	1	0
	ledvinová kolika	1	0
běžné poruchy	zpomalené reakce pacientů po ránu	3	0
	astenie	1	0

	bolest v bederní oblasti	0	1
ostatní poruchy	trauma po dopravních nehodách	0	1
Testovaný lék: preparát ve formě tabletek obsahující přesně stanovené množství dvou rostlinných extraktů (<i>Crataegus oxyacantha</i> a <i>Eschscholzia californica</i>) a magnesium; placebo: tabletky identického vzhledu.			

2.4.5 Diskuze

Naše studie dokazuje, že pravidelné podávání preparátu (dvě tabletky 2x denně), který obsahoval přesně stanovené množství dvou extraktů z rostlin (*Crataegus oxyacantha* a *Eschscholzia californica*) a magnesium po dobu 3 měsíců zlepšilo klinický stav dospělých pacientů, kteří navštívili lékaře s mírnou nebo středně mírnou úzkostí, která byla spojená s funkčními poruchami.

Studie byla prováděna podle klasického postupu: multicentrická, randomizovaná, dvojitě zaslepená studie prováděná se dvěma skupinami pacientů, které byly vzájemně porovnány (skupina, která užívala testovaný lék a placebo skupina). Období, po které studie probíhala, tedy 3 měsíce, však bylo delší než je obvyklé u studií zaměřených na účinnost nových anxiolytik (4 týdny)^{6,16-18}. To, že jsme si zvolili delší dobu léčby bylo proto, že jednou ze složek přítomných v testovaném léku bylo magnesium. Bylo prokázáno, že je potřeba alespoň období tří měsíců k zjištění účinnosti léků, které obsahují magnesium.¹⁹

Pacienti byli zařazeni do studie na základě přesných diagnostických kritérií: generalizované úzkosti podle kritérií DSM-III-R, které se používaly v době studie a celkového skóre úzkosti na Hamiltonově stupnici v rozmezí 16 až 28. Tato kritéria sloužila k minimalizaci toho, aby do studie byli zařazeni pacienti s depresemi, protože není vždy jednoduché rozlišit v lékařské praxi zda se jedná o úzkost nebo depresi.^{3,4} Vzhledem k významnosti somatických poruch jako jednoho z důvodů proč pacienti s úzkostí navštíví svého praktického lékaře jsme se ještě navíc rozhodli zařadit do studie jen pacienty, jejichž somatické skóre úzkosti tvořilo na Hamiltonově stupnici alespoň polovinu jejich celkového skóre úzkosti.

Pro zhodnocení účinnosti testovaného léku bylo nutné použít několik různých způsobů hodnocení, abychom zobrazili různé aspekty patologie a jejich projevů: Hamiltonovu stupnici, vizuální analogovou stupnici, do které vyplňovali údaje pacienti a celkový klinický dojem lékařů, kteří studii prováděli. Tyto způsoby hodnocení a zejména Hamiltonova stupnice jsou používány často u studií týkajících se terapeutické účinnosti psychotropních léků.^{6,16-18}

Při analýze dat pacientů před zahájením studie nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi oběma léčenými skupinami. V klinické praxi bylo vypořádováno, že pacienti jsou obvykle ženy⁸.

U obou způsobů léčby (testovaného léku a placebo) bylo prokázáno, že mají účinek na úzkost. Od prvního týdne vedly oba způsoby léčby k rychlému snížení celkového a somatického skóre úzkosti na Hamiltonově stupnici a skóre na vizuální analogové stupnici, které pokračovalo. Placebo efekt byl však menší než účinek testovaného léku. Dále se také ukázalo, že rozdíl mezi oběma způsoby léčby se v průběhu času zvýšil, ale pro potvrzení tohoto trendu by bylo potřeba provést delší studii.

Placebo efekt při hodnocení účinku psychotropních látek byl popsán už v mnoha klinických studiích^{17,18}. První výsledky meta-analýzy byly publikovány už v roce 1955. Většina odborníků souhlasí s tím, že zlepšení související s podáváním placebo při klinických studiích je přibližně 35%²⁰. Bylo také prokázáno, že tento nespecifický placebo efekt je zvláště výrazný u mírných poruch a ne tak výrazný při léčbě závažnějších poruch. Tedy v případě generalizovaných úzkostných poruch, účinnost placebo (které bylo testováno společně s bromazepamem) by mohla být až 65%, zatímco v případech schizofrenie (kdy bylo placebo testováno společně s chlorpromazinem) se blíží 25%²⁰. V naší studii kdy celkové skóre úzkosti na Hamiltonově stupnici pokleslo z 22,4 v D0 na 13,6 v konečném bodě ($\Delta = - 8,6$) se placebo efekt blížil 40%.

Testovaný lék byl efektivnější než placebo, s větším poklesem viditelným u celkového skóre úzkosti na Hamiltonově stupnici, rozdíl mezi výchozím a konečným bodem byl statisticky významný. Celkové skóre pokleslo z 22,7 na 12,2 ($\Delta = - 10,6$) s účinností testovaného léku přibližně 47%. Podobné výsledky jsme získali u všech studovaných kritérií: somatické skóre úzkosti na

Hamiltonově stupnici, skóre na visuální analogové stupnici a celkový klinický dojem lékařů, kteří studii prováděli. Podobně bylo procento pacientů, u kterých měla léčba pozitivní účinek (alespoň 50% pokles u skóre mezi D0 a posledním hodnocením) významně vyšší u skupiny, která dostávala testovaný lék než u placebo skupiny bez ohledu na kritéria hodnocení (celkové nebo somatické skóre úzkosti na Hamiltonově stupnici nebo skóre na visuální analogové stupnici). I když byly rozdíly (ne vždy významné při každém měření) zjištěné mezi testovaným lékem a placebem malé, byly koherentním a konvergentním důkazem účinnosti testovaného léku.

Bezpečnost testovaného léku byla uspokojivá: nebylo hlášeno žádné úmrtí a ani žádné vážné vedlejší účinky, které by souvisely s podáváním testovaného léku. Vedlejší účinky byly převážně mírné nebo středně mírné povahy. Procento pacientů, u kterých se objevil alespoň jeden druh nějakých zdravotních potíží (nežádoucích příhod) se významně nelišilo u obou skupin. Nicméně u skupiny, která užívala testovaný lék se objevily čtyři případy nevolnosti (jeden z nich byl vážný a vedl k předčasnému ukončení léčby) a zpomalené reakce pacientů po ránu (tři případy), zatímco v placebo skupině žádné takové případy hlášeny nebyly. U skupiny, která užívala testovaný lék byly různé zdravotní potíže (nežádoucí příhody) převážně zažívací potíže nebo psychické poruchy. Tyto různé zdravotní potíže (nežádoucí příhody) byly shodné s počáteční diagnózou úzkosti doprovázenou funkčními poruchami a nejběžnějšími vedlejšími účinky, které jsou spojené s bylinnými preparáty nebo preparáty, které obsahují magnesium. Lišily se však od těch, které byly pozorovány po podávání benzodiazepinu (např. ospalost, pocit opilosti).

Bylo by zajímavé mít ve studii skupinu pacientů, kteří by byli pro úzkostné poruchy léčeni benzodiazepiny.²¹ Ale neudělali jsme to, protože jsme nehledali náhradu za benzodiazepiny, ale spíše řešení jak by měl praktický lékař léčit mírnou a středně mírnou úzkost bez benzodiazepinů a jejich vedlejších účinků. To se nám zdálo jako smysluplný cíl. Ashton⁵ zastává názor, že benzodiazepiny by se neměly předepisovat u mírných úzkostí, a že v případech chronické generalizované úzkosti by měly být předepisovány jen v podobě krátkodobé léčby od dvou do čtyř týdnů s následným postupným vysazením léku.

2.4.6 Závěr

Naše studie dostatečně prokázala bezpečnost a větší terapeutickou účinnost testovaného léku než placebo při léčbě mírných a středně mírných úzkostí. Tato studie však neumožnila zjistit jakou roli má každá jednotlivá aktivní složka testovaného léku.

Praktičtí lékaři, kteří byli zapojeni do studie patří ke klinickému výzkumnému týmu, který se specializuje na hodnocení účinnosti léků u mentálních poruch a prošli školením jak používat Hamiltonovu stupnici (léky byly předepisovány ambulantně). Naše zjištění jsou použitelná pro širokou veřejnost pacientů, kteří navštíví praktického lékaře z důvodu mírných a středně mírných úzkostných poruch, které jsou spojené s funkčními poruchami (Ve Francii více než 80% anxiolytických a hypnotických léků předepisují praktičtí lékaři²²)

Dospěli jsme k závěru, že preparát ve formě tabletek, které obsahují přesně stanovené množství *Crataegus oxyacantha*, *Eschscholtzia californica* a magnesium je efektivní a bezpečnou alternativní symptomatickou léčbou pro mírné a středně mírné stavy úzkosti v klinické praxi.

2.4.7 Poděkování

Studie byla financována farmaceutickou firmou Laboratoires Innothera, Francie.

Autoři článku děkují všem lékařům, kteří byli do studie zapojeni.

2.4.8 Literatura

- ¹ Martin C, Maurice-Tison S, Tignol J. [Anxiety disorders in general practice: frequency-treatment. A survey of the Aquitaine Sentinel Network]. (Úkostné poruchy v praxi praktického lékaře: frekvence-léčba. Průzkum prováděný Aquitaine Sentinel Network) [French]. *Encephale* 1998;24:120-4
- ² Pelissolo A, Boyer P, Lepine JP, Bisserte JC. [Epidemiology of use of anxiolytic and hypnotic drugs in France and in the world.] (Epidemiologická studie použití anxiolytických a hypnotických léků ve Francii a na celém světě.) [French]. *Encephale* 1996;22:187-96
- ³ Edwards JG. Clinical anxiety and its treatment. *Neuropeptides*. (Klinická úzkost a její léčba. Neuropeptidy). 1991;19 (Suppl):1-10
- ⁴ Pelissolo A. [Detection and diagnosis of anxiety]. (Detekce a diagnóza úzkosti) [French]. *Rev Prat* 1999;49 (Suppl 14):S5-10
- ⁵ Ashton H. Guidelines for the rational use of benzodiazepines. When and what to use. (Guideliny pro racionální užití benzodiazepinů. Kdy a co užívat.) *Drugs*. 1994;48:25-40
- ⁶ Cohn JB, Rickels K. A pooled double-blind comparison of the effects of busperidone, diazepam and placebo in women with chronic anxiety. (Společné dvojité zaslepené srovnání efektu busperidonu, diazepamu a placeba u žen s chronickou úzkostí). *Curr Med Res Opin* 1989;11:304-20
- ⁷ Tyrer P., Murphy S, Riley P. The benzodiazepine withdrawal symptom questionnaire. (Dotazník týkající se abstinenčních symptomů benzodiazepinu). *J. Affect Dis* 1990;19:53-61
- ⁸ ANAES. Guidelines Department. Diagnosis and outpatient management of generalised anxiety disorder in adults. (Diagnóza a ambulantní léčba generalizovaných úkostných poruch u dospělých). březen 2001, Guideliny týkající se klinické praxe [online] jsou dostupné na <http://www.anaes.fr/ANAES/framedf.nsf> (zprístupněno 2. září 2003)
- ⁹ Bourin M, Bougerol T, Guitton B, Broutin E. A combination of plant extracts in the treatment of outpatients with adjustment disorder with anxious mood: controlled study versus placebo. (Kombinace rostlinných extraktů při léčbě ambulantních pacientů s poruchami přizpůsobivosti s úkostnou náladou: kontrolovaná studie versus placebo.) *Fundam Clin Pharmacol* 1997;11:127-32
- ¹⁰ Walker AF, Marakis G, Morris AP, Robinson PA. Promising hypotensive effect of hawthorn extract: a randomised double-blind pilot study of mild, essential hypotension. (Slibný hypotenzí účinek extraktu z hlohu: dvojité zaslepená, randomizovaná, pilotní studie mírné esenciální hypotenze.) *Phytother Res* 2002;16:48-54
- ¹¹ Schäfer HL, Schafer H, Schneider W, Elstner EF. Sedative action of extract combination of *Eschscholtzia californica* and *Corydalis cava*. (Sedativní účinek kombinace extraktu z *Eschscholtzia californica* a *Corydalis Cava*.) *Arzneimittelforschung* 1955;45:124-6
- ¹² Grimaldi BL. The central role of magnesium deficiency in Tourette's syndrome. Causal relationship between magnesium deficiency, altered biochemical pathways and symptoms

relating to Tourette's syndrome and several reported comorbid conditions. (Ústřední role nedostatku magnesia u Tourettova syndromu. Kauzální vztah mezi nedostatkem magnesia, upravená biochemická dráha a symptomy související s Tourettovým syndromem a několik hlášených případů komorbiditu). *Med. Hypotheses* 2002;58:47-60

¹³American Psychiatric Association. 300.02 Anxiété généralisée (Trouble). In: A.P.A. Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-III-R). Traduction Française [French]. Paris: Masson, 1989:283-6

¹⁴Hamilton M. The assessment of anxiety states by rating. (Hodnocení stavů úzkosti.) *Br. J Med Psychol* 1959;32:30-5

¹⁵Anonymous. Clinical global impressions. (Neznámí autoři. Celkový klinický dojem.) *Psychopharmacol Bull* 1985;21:839-43

¹⁶Morton S, Lader M. Studies with alpidem in normal volunteers and anxious patients. (Studie prováděné s alpidemem u zdravých dobrovolníků a pacientů s úzkostí.) *Pharmacopsychiatry* 1990;23 (Suppl. 3):120-3

¹⁷Aufdembrinke B. Abecarnil, A new beta-carboline in the treatment of anxiety disorders. (Nový beta-karbolin při léčbě úzkostných poruch) *Br. J. Psychiatry* 1998; 34 (Suppl.):55-63

¹⁸Lader M, Scotto JC. A multicentre double-blind comparison of hydroxyzine, buspirone and placebo in patients with generalized anxiety disorder. (Multicentrické dvojité zaslepené srovnání hydroxyzinu, buspironu a placeba u pacientů s generalizovanou úzkostnou poruchou). *Psychopharmacology* 1998;139:402-6

¹⁹Agnolia A, Nappi G., Sandrini G, De Romanis F. Role of magnesium administration in neuronal hyperexcitability syndrome. (Úloha podávání magnesia u syndromu neurální hyperexcitability). In: Itokawa Y, Durlach J, editors. *Magnesium in Health Disease*. Londýn-Paříž: John Libbey & Co, 1989: 299-305

²⁰Bech P. Methods of evaluation of psychoactive drugs. (Metody hodnocení psychoaktivních léků). *Recenti Prog. Med.* 1989;80:706-11

²¹Anonymous. Venlafaxine and generalised anxiety disorder: new preparation. Minimise recourse to drugs. (Neznámí autoři. Venlafaxin a generalizaované úzkostné poruchy: nový preparát. Minimalizuje opětovné užívání léku). *Prescrire Int.* 2001;10:131-4

²²Legrain M. Rapport du Groupe de Réflexion sur l'Utilisation des Hypnotiques et des Tranquillisants en France [French]. Paříž: SNIP, 1990

Adresa pro korespondenci: Dr. Marc Mathieu Medical Affairs, Laboratoires Innothera, 7-9 avenue Francois Vincent Raspail, 94110 Arcueil, Francie, Tel.: +33 1 46151800;
Email: Marc.MATHIEU@innothera.com

2.5 Metody použité k testování

2.5.1 Extrakce

Extrakce je založena na principu distribuce látky mezi dvě fáze a na základě jejich různé rozpustnosti. Extrakcí tuhé látky kapalinou se selektivně převádějí některé složky směsi tuhých látek do vhodných rozpouštědel a to buď na základě pouhého fyzikálního principu rozpouštění anebo v kombinaci s chemickou reakcí. Extrakce představuje první krok při izolaci látek.²⁶

2.5.2 Filtrace za sníženého tlaku (odsávání)

V průběhu filtrace dochází k oddělování pevné fáze od fází ostatních pomocí propustného materiálu, který pevnou fázi zachycuje a dovoluje prostup fázím ostatním. Nejběžnější filtrační operací je odsávání. Při něm se nejčastěji používá Büchnerova nálevka, kdy při práci musí být položený filtr na perforované desce nálevky. Aby dokonale přilnul, lze ho smočit rozpouštědlem (v němž je připraven roztok filtrovací látky). Rychlost filtrace je výrazně snížena tím, že k přestupu kapaliny otvory ve filtru dochází prakticky jen v místech, kde je filtrační papír v kontaktu s otvory nálevky. Filtrovanou suspenzi je třeba na filtr pravidelně dolívat, aby byl koláč stále pod hladinou kapaliny a nevznikaly trhliny, které způsobují nestejněměrné odsání zbylé kapaliny.²⁶

2.5.3 Odpařování za sníženého tlaku

Při odpařování je prioritní zájem na získání pevného odparku, nepoškozeného a v žádané konzistenci. Tento postup našel uplatnění při zahušťování extraktů, chromatografických frakcí atd.

Odparky jsou v současnosti používány velmi obsáhle. Baňka s odpařenou tekutinou, otáčí se v šikmé poloze kolem své osy a je připojena k účinnému vodnímu chladiči prostřednictvím motorové jednotky. Rotací se na vnitřní ploše neustále obnovuje film kapaliny a za současného stejnoměrného ohřevu baňky ve vodní lázni probíhá odpařování z tohoto velkého povrchu

stejněměrně a rychle. K těsnění se používají běžná mazadla, pokud je kontaminace zcela nežádoucí pak je nutné zvolit např. teflonové manžety. Dostačující zdroj vakua poskytuje chemické membránové čerpadlo, nebo vodní vývěva s pod tlakem 1 – 1,5 kPa.²⁶

2.5.4 Chromatografie

Chromatografie je fyzikálně chemický separační proces, používaný k dělení směsi látek na jednotlivé složky. V jeho průběhu se tyto složky pohybují nestejněměrně v systému dvou fází: stacionární (adsorbent) a mobilní (rozpouštědlo, eluent).

Má tři základní fáze: nanesení vzorku
dělící proces
detekci

Při chromatografii je celkové množství látky rozděleno vždy mezi stacionární a mobilní fázi. Jedná-li se o nejběžnější případ, tak je rychlost dělení látky nižší než rychlost pohybu rozpouštědla. Tento případ je prakticky využitelný a téměř vždy žádaný.²⁶

Látky se v chromatografickém systému pohybují ve formě zón (skvrn). Při dané rychlosti mobilní fáze je rychlost této zóny úměrná zlomku z celkového množství chromatografované látky, která se vyskytuje v mobilní fázi. Tento zlomek je daný distribuční konstantou dělené látky v systému dvou konkrétních fází (stacionární a mobilní). Distribuční konstanta, určující obsah látky v pohyblivé fázi udává i celkový čas, po který tato složka setrvává na absorbentu. Tím je daný čas zadržení nebo zpomalení pohybu rozpouštěné látky.

Po upravení směsi látek do chromatografického systému se každá látka rychle rozdělí mezi obě fáze ve snaze dosáhnout sorpční rovnováhy. Ta je neustále porušována tokem mobilní fáze. Látka o určité koncentraci v mobilní fázi je unášena z oblasti, kde byla její koncentrace v rovnováze s koncentrací ve fázi stacionární, do oblasti, kde je ve stacionární fázi menší koncentrace.

V přední části zóny je proto koncentrace této látky trvale vyšší než rovnovážná a v důsledku toho dojde k přestupu látky do fáze stacionární, na

absorbent. V zadní části zóny je situace opačná: na místo směsi, která byla předtím v rovnováze s koncentrací chromatografované látky ve stacionární fázi, přichází směs, obsahující menší množství této látky až čisté rozpouštědlo, tzn., že dochází k přestupu látky do mobilní fáze. Je tedy zřejmé, že uprostřed zóny nedochází ani k sorpci ani k desorpci a je zde během migrace stav trvale blízký rovnováze.

Je snahou, aby se látky během dělení pohybovaly ve formě úzkých ostrých zón. Během procesu se zóny vždy rozšiřují, protože dělení není závislé jen na hlavním dělicím procesu, ale uplatňují se i principy další.²⁶

2.5.4.1 Kolonová(sloupcová) chromatografie

Při kolonové pracovní metodice se směs látek, určená k dělení, vnese vhodným způsobem na absorbent v chromatografické trubici, na kolonu se vlévá eluent, který z kolony vytéká a obsahuje dělené směsi, nazývá se eluát a jímá se po frakcích konstantního objemu.²⁶

2.5.4.2 Chromatografie v plošném uspořádání

Absorbent (stacionární fáze) je při této metodě nanesený ve vrstvě určité tloušťky na neutrální podložce. Neutrální podložkou je skleněná deska či kovová folie, jedná se o tenkovrstvou chromatografii.²⁶

2.5.4.2.1 Tenkovrstvá chromatografie (Thin-Layer chromatography TLC)

Dělení směsi látek probíhá na základě kapilárního nasávání rozpouštědla stacionární fází, protože deska je svou dolní hranou ponořená do eluční soustavy v chromatografické nádobě. Přitom se uplatňují podle povahy sorbentu a složení mobilní fáze všechny známé principy chromatografického

dělení a to buď každý sám nebo ve vzájemné kombinaci. Tento typ chromatografie umožňuje výkonné dělení podle charakteru systému a způsobu provedení.²⁶

2.5.5 Krystalizace

Pojmem krystalizace se obecně označuje vylučování pevné látky z roztoků nebo tavenin ve formě krystalů. V preparativní organické chemii je většina látek charakterizovaná teplotou tání, která je jedním z kritérií čistoty a individuality.

Volba rozpouštědla je nejdůležitějším faktorem, určující jak výtěžek, tak čistotu produktu. Jedním z nástrojů krystalizace je snaha dosáhnout maximální rozpustnosti čištěné látky za varu rozpouštědla a minimální rozpustnosti za normální nebo mírně zvýšené teploty, přičemž nečistoty mají mít velmi omezenou rozpustnost. Protože se obvykle rozpustnost nečistot blíží rozpustnosti hlavní složky a navíc se uplatňuje solubilizační efekt, je nutné provádět krystalizaci několikrát. Látka se nejlépe rozpouští v rozpouštědlech, které jsou jí nejbližší. To ovšem neznamená, že v nich bude dobře krystalizovat. Všeobecně platí, že:

- a) v řadě rozpouštědel podle klesajícího hydrofilního charakteru mají rozpouštědla uprostřed řady poměrně širokou rozpouštěcí schopnost
- b) ve skupině rozpouštědel podobného charakteru mají větší rozpouštěcí schopnost většinou rozpouštědla s vyšší teplotou varu.

Z toho je zřejmé, že např. alkaloidní báze se dobře rozpouští v benzenu nebo chloroformu.²⁶

Aby nastala krystalizace z roztoku, musí být porušena fázová rovnováha soustavy, tzn. že roztok musí být přesycený. Tento fakt je však jen podmínkou krystalizace, nikoli příčinou. Tou je vytvoření krystalizačních center na nichž dochází při změně entropie systému k narůstání krystalů.

Látky krystalizují určitou rychlostí, která je daná řadou faktorů, např. symetrií molekuly, její velikostí a charakterem funkčních skupin, přítomností

znečištěnin, vody aj. faktory. Proto rychlost krystalizace nemusí být vždy v přímé korelaci s vytvářením krystalizačních center.²⁶

3 Experimentální část

3.1 Charakteristika zpracovaného materiálu

Droga: *Eschscholziae herba*

Extrakt: hnědá polotuhá hmota

Chromatografické frakce alkaloidů: nažloutlé až žluté roztoky přes zelené až hnědé roztoky

Krystaly: nažloutlé až bílé

3.2 Rozpouštědla, chromatografický materiál a přístroje

3.2.1 Rozpouštědla

Chloroform p.a. (CHCl_3)

Ethanol 96% p.a.

Benzen p.a.

Methanol p.a.

Destilovaná voda

Toluen p.a.

Ethylacetát p.a.

Xylen p.a.

Butanon p.a.

Diethylamin p.a.

Aceton p.a.

Octová kyselina p.a.

Acetonitril p.a.

3.2.2 Chromatografický materiál

Oxid křemičitý (silikagel) je nejvíce používaným anorganickým adsorbentem. Má velkou sorpční kapacitu a snadno se připraví různé typy s rozdílnou velikostí pórů a rozdílným celkovým povrchem.

Pro adsorpční chromatografii má největší význam adsorbent s velikostí pórů kolem 6nm.

Je vhodný pro dělení velké většiny látek, avšak z důvodů slabě kyselého povrchu (pH 3-5) se nehodí pro silně bazické látky, které se na něj vážou. Nežádoucí jevy, projevující se při jeho použití, lze odstranit impregnací některými činidly.

Silikagel je typickým polárním adsorbentem, u kterého se uplatňují dva faktory: vazba vodíkovými můstky a disperzními silami.

Silufol je nanesený širokoporézní silikagel na flexibilní hliníkové podložce, fixovaný rýžovým škrobem. Používá se prakticky jen pro analytické účely. Používáme TLC hliníkovou folii silikagel 60 F154 20 x 20 cm, tloušťka vrstvy 0,2 mm (Merk).²⁶

3.2.3 Přístroje

rotační vakuová odparka typu BÜCHI ROTAVAPOR R -114

vodní lázeň – BÜCHI WATER BATH B – 480

vzduchová pumpa – ELITE 802

fén

váhy KERN 440 – 35 A

elektrický vařič – FISHER SCIENTIFIC

Koflerův blok

počítač (PC program ISIS DRAW)

3.2.4 Laboratorní sklo a další pomůcky

Zkumavky

Kádinky

Erlenmeyerovy baňky

Baňky destilační

Nálevky

Násypky

Pipety

Odměrné válce

Chromatografické kolony

Chromatografická vyvíjecí komora

Kovový stojan

Svorky

Malé držáky

Lapáky se svorkou

Stojany na zkumavky

Lžičky

Pinzety

Špachtle

3.2.5 Vyvíjecí soustavy a detekční činidla

Vyvíjecí soustavy – zkoušené

Chloroform : Benzen : Methanol
4 : 5 : 1
Chloroform : Ethylacetát : Methanol
4 : 4 : 2
Chloroform : Ethylacetát : Methanol
3 : 4 : 3
Chloroform : Ethylacetát : Methanol
3 : 4 : 2
Chloroform : Ethylacetát : Methanol
3 : 3 : 3
Chloroform : Ethanol
1 : 1
Chloroform : Ethanol
3 : 7
Chloroform : Ethylacetát : Methanol
3 : 3 : 4
Xylen : Butanon : Methanol : Diethylamin
5 : 4 : 0,75 : 0,25
Chloroform : Ethylacetát : Methanol
3 : 5 : 2
Chloroform : Ethylacetát : Voda
4 : 4 : 2
Chloroform : Ethylacetát : Octová kyselina
4 : 4 : 2
Methanol : Butanol : Benzen : Voda
12 : 3 : 2 : 3
Aceton : Acetonitril : Octová kyselina
5 : 3 : 2

Buthanol : Octová kyselina : Voda				
5	:	1	:	2
Aceton : Acetonitril : Octová kyselina : Toluén				
5	:	3	:	2 : 5

Vhodná vyvíjecí soustava - alkaloidy

Ethanol : Octová kyselina : Voda				
6	:	3	:	1

Detekční činidla³⁵

Zkoušená detekční činidla : Jodoplatinát draselný

Cerité činidlo

Dragendorffovo činidlo

Vhodné detekční činidlo : Dragendorffovo činidlo

(postřikový roztok: 5ml Dragendorffova činidla, 10g vinné kyseliny, 50ml vody)

Vhodná vyvíjecí soustava – flavonoidy

Ethanol : Octová kyselina : Voda				
6	:	3	:	1

Standardy – kontrolní TLC (Sigma – výrobce standardů)

kyselina kávová

kyselina ferulová

rutin

kvercetin

isorhamnetin

Detekční činidlo³⁵

1% roztok vanilinu v čistém Et-OH : 3% kyselina chloristá 1 : 1

Po postřiku detekčním činidlem byl chromatogram zahříván nad elektrickým vaříčem.

3.3 Postup extrakce alkaloidů z *Eschscholzia californica* Cham.

3.3.1 Původ drogy

Droga (sušená nať s kořeny) byla získána sběrem introdukované kultury (komerční osivo) firmou Planta Naturalis (Markvartice u Sobotky).²⁷

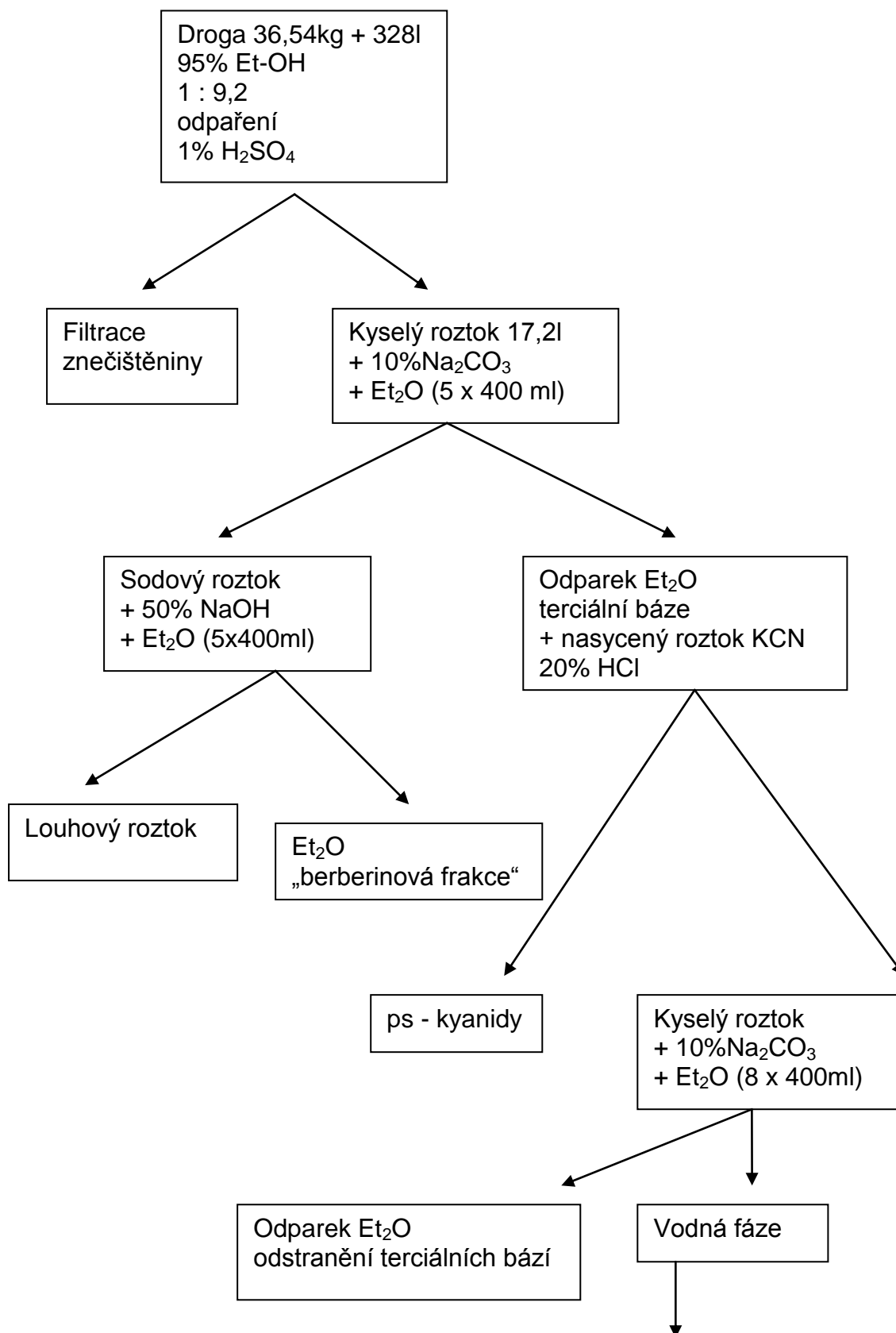
3.3.2 Příprava primárního extraktu a jeho čištění

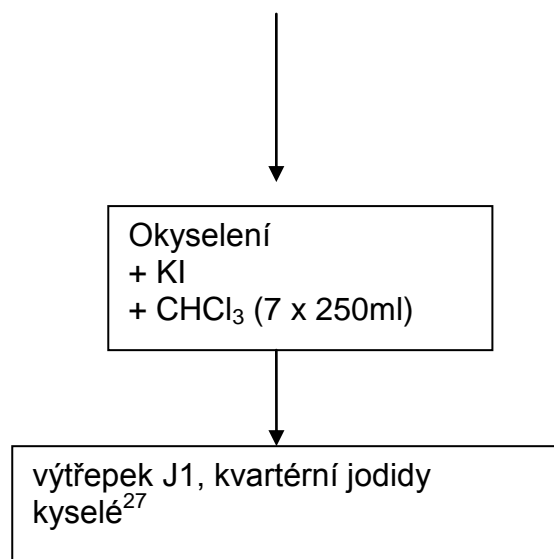
36,54 kg drogy bylo umístěno do perkolátoru, zalito Et-OH 95% a po dvou dnech stání perkolováno celkem 328 litry (1 : 9,2). Získaný extrakt byl zahuštěn na cca 4 litry a následně digerován při 50°C 3x několika litry 1% H₂SO₄; vodná vrstva byla vždy slita. Byl získán kyselý hnědý roztok. Tento spojený hnědý digerát byl zfiltrován nejprve přes viskózní filtr, posléze přes vrstvu křemeliny. Jeho celkový objem byl 17,2 litrů.²⁷

3.3.3 Příprava alkaloidního výtřepku J1

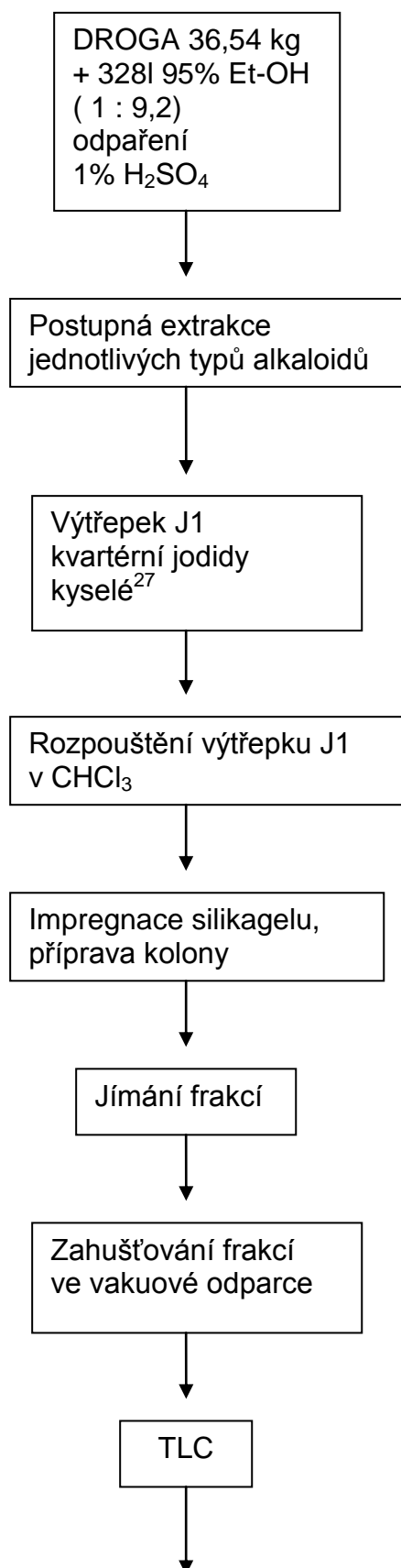
Výtřepky J1 jsou kvartérní alkaloidy, které byly získány po odstranění terciálních bazí z nati s kořeny *Eschscholzia californica* Cham. Zbýlý extrakt byl okyselen na pH cca 3, přidán jodid draselný a jodidy vytřepány do chloroformu. Výtřepky jsou označeny v protokolu jako „J1, kvartérní jodidy kyselé.“²⁷

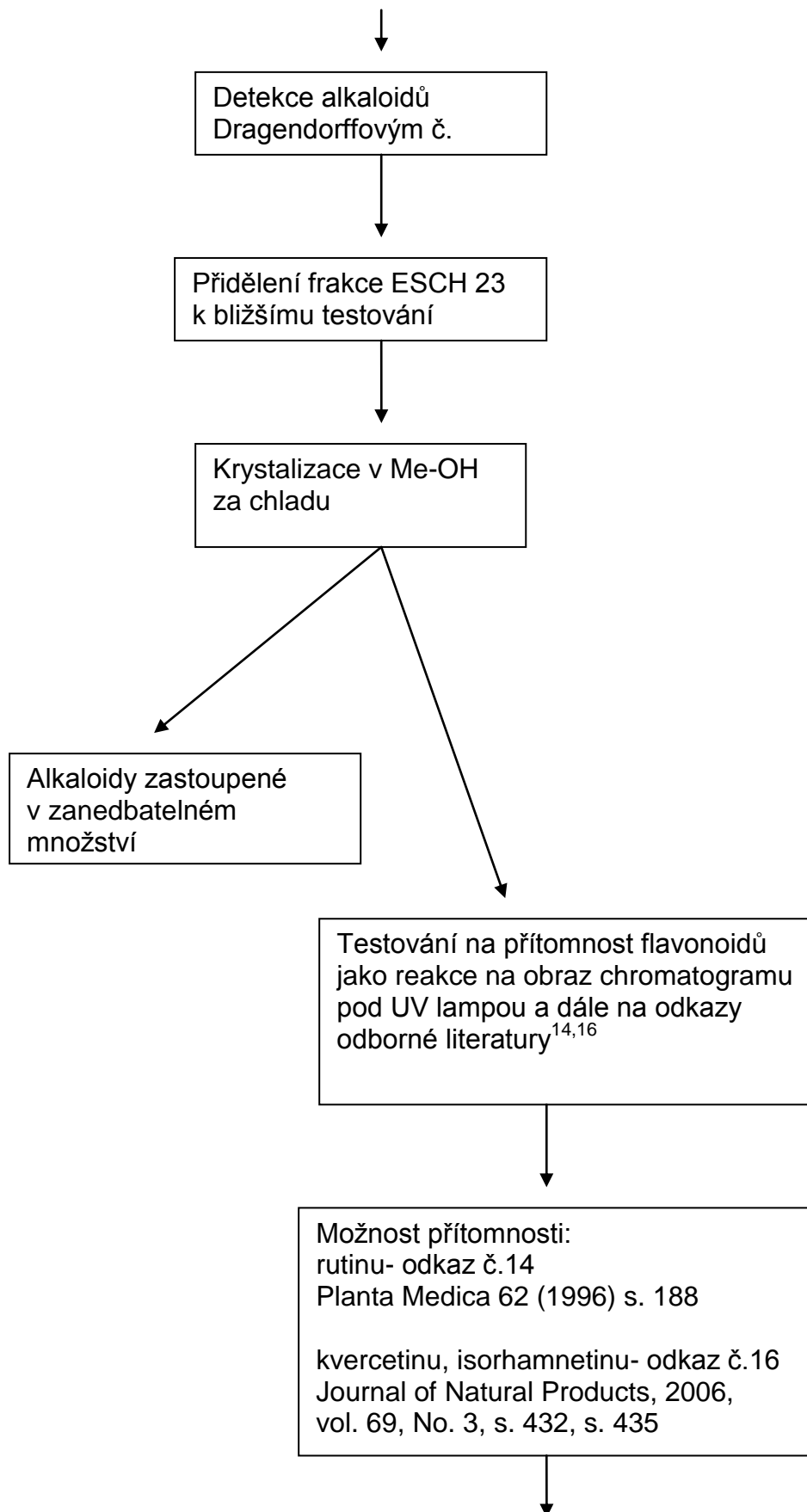
3.4 Schéma přípravy výtřepku alkaloidů

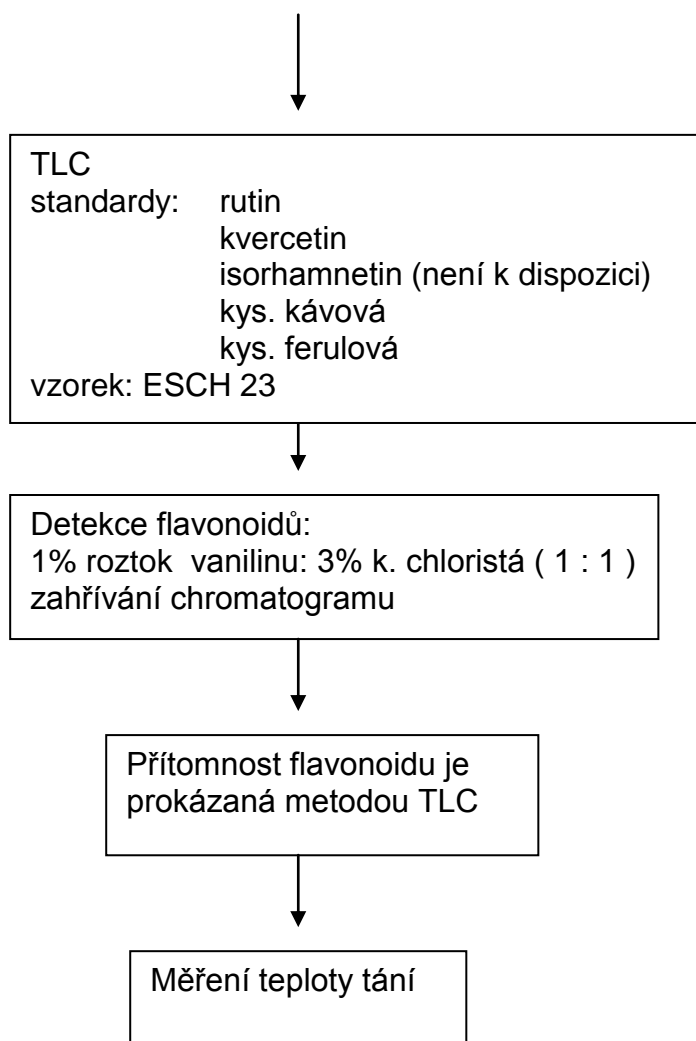




3.5 Celkové schéma zpracování materiálu







3.6 Izolace obsahových látek pomocí preparativní chromatografie

Připravený výtřeppek J1, kvartérní jodidy kyselé, využijeme jako výchozí materiál pro separaci obsahových látek sloupcovou chromatografií.

Dělení výtřepku J1 probíhá na silikagelové sloupcové koloně. Zpracujeme 60g výtřepku. Silikagel zbavíme vody, zahříváme 4 h při 160°C a následně upravíme obsah vody na 12%. Množství aktivovaného silikagelu na koloně činí 500g. Dále připravíme roztěr na kolonu. Výtřeppek J1 rozpustíme v minimálním množství CHCl_3 , poté přidáme 100g silikagelu a směs odpaříme do sucha na porcelánové misce, za občasné homogenizace.

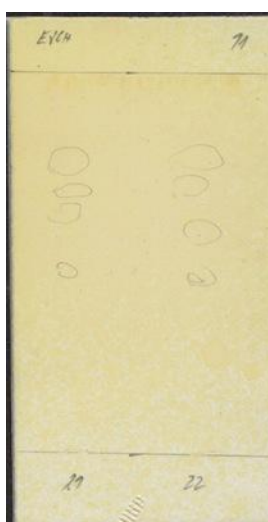
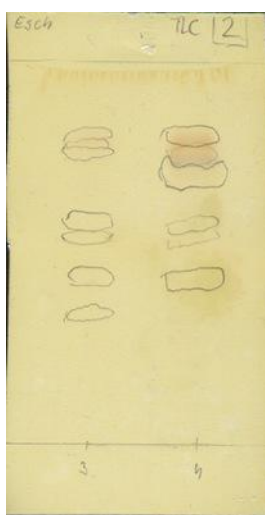
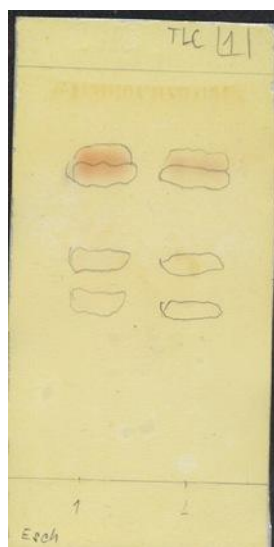
Jako eluční činidlo pro silikagelovou kolonu použijeme čistý CHCl_3 . Mrtvý objem CHCl_3 je 1350 ml. Dále eluujeme postupně s chloroformem se zvyšujícím se procentem Et – OH a končíme u 55% Et – OH. Získáme 125 frakcí a provedeme TLC ve vybrané vhodné soustavě – Et – OH : kys. octová : voda v poměru 6 : 3 : 1 a detekujeme Dragendorffovým činidlem. Eluované frakce, které se ukazují na základě TLC jako vhodné, zpracováváme dále.

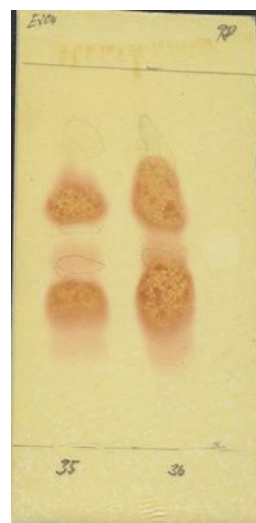
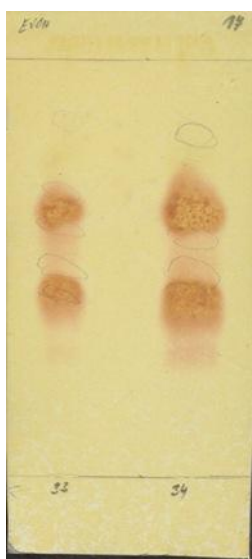
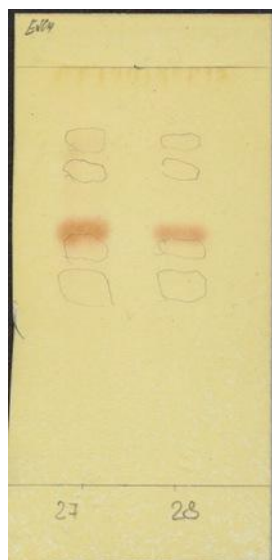
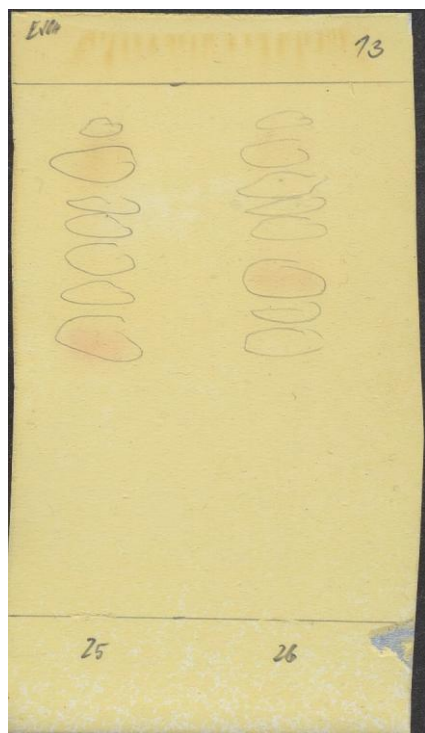
Číslo frakce	Barva	Chloroform s x% Et - OH
1	žluto – hnědá	čistý chloroform
2	světle žlutá	čistý chloroform
3	světle žlutá	čistý chloroform
4	žlutá	čistý chloroform
5	zelená	čistý chloroform
6	světle žlutá	čistý chloroform
7	světle žlutá	čistý chloroform
8	světle žlutá	čistý chloroform
9	světle žlutá	čistý chloroform
10	světle žlutá	čistý chloroform
11	světle žlutá	čistý chloroform
12	světle žlutá	čistý chloroform
13	světle žlutá	0,5% Et – OH
14	světle žlutá	0,5% Et – OH
15	tmavě žlutá	0,5% Et – OH
16	světle žlutá	0,5% Et – OH
17	světle žlutá	0,5% Et – OH
18	světle žlutá	1% Et – OH
19	světle žlutá	1% Et – OH
20	světle oranžová	1% Et – OH
21	světle žlutá	1% Et – OH
22	světle oranžová	1% Et – OH
23	světle žlutá	1% Et – OH
24	žlutá	1% Et – OH
25	světle oranžová	1% Et – OH
26	světle oranžová	1% Et – OH
27	světle žlutá	1% Et – OH
28	žlutá	1% Et – OH
29	žlutá	1% Et – OH
30	světle oranžová	2% Et – OH

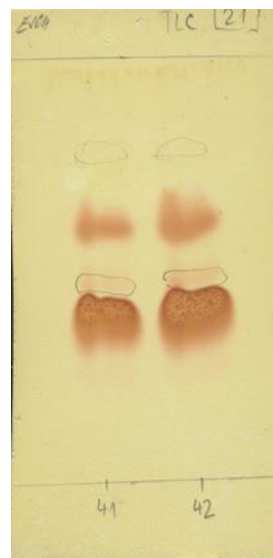
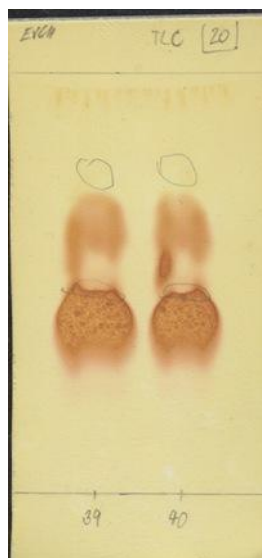
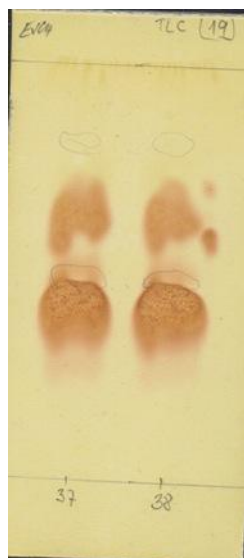
31	oranžová	2% Et – OH
32	oranžová	2% Et – OH
33	oranžová	2% Et – OH
34	světle oranžová	2% Et – OH
35	žlutá	2% Et – OH
36	žlutá	2% Et – OH
37	žlutá	2% Et – OH
38	žlutá	2% Et – OH
39	žlutá	2% Et – OH
40	žlutá	2% Et – OH
41	žlutá	2% Et – OH
42	žlutá	2% Et – OH
43	žlutá	2% Et – OH
44	žlutá	2% Et – OH
45	žlutá	2% Et – OH
46	žlutá	2% Et – OH
47	žlutá	2% Et – OH
48	světle žlutá	2% Et – OH
49	světle žlutá	2% Et – OH
50	světle žlutá	2% Et – OH
51	světle žlutá	2% Et – OH
52	světle žlutá	2% Et – OH
53	světle žlutá	2% Et – OH
54	světle žlutá	2% Et – OH
55	světle žlutá	2% Et – OH
56	světle žlutá	2% Et – OH
57	světle žlutá	2% Et – OH
58	světle žlutá	2% Et – OH
59	světle žlutá	2% Et – OH
60	světle žlutá	2% Et – OH
61	světle žlutá	2% Et – OH
62	světle žlutá	2% Et – OH

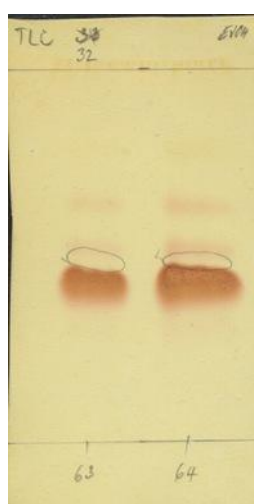
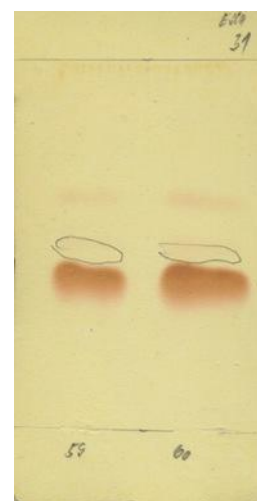
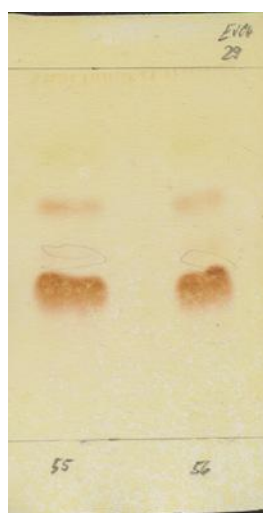
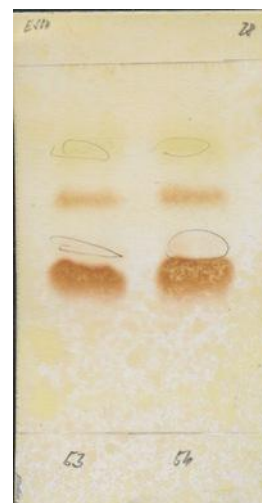
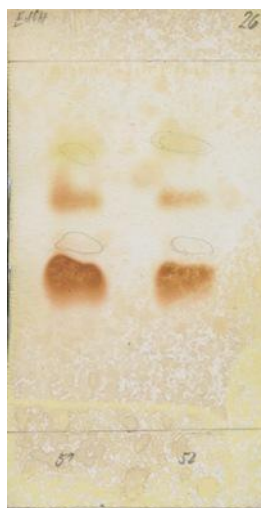
63	světle žlutá	2% Et – OH
64	světle žlutá	2% Et – OH
65	světle žlutá	2% Et – OH
66	světle žlutá	2% Et – OH
67	světle žlutá	2% Et – OH
68	světle žlutá	2% Et – OH
69	světle žlutá	2% Et – OH
70	světle žlutá	3% Et – OH
71	světle žlutá	3% Et – OH
72	světle žlutá	3% Et – OH
73	světle žlutá	3% Et – OH
74	světle žlutá	3% Et – OH
75	světle žlutá	5% Et – OH
76	světle žlutá	5% Et – OH
77	světle žlutá	5% Et – OH
78	světle žlutá	5% Et – OH
79	světle žlutá	5% Et – OH
80	světle žlutá	5% Et – OH
81	světle oranžová	5% Et – OH
82	světle žlutá	5% Et – OH
83	světle žlutá	5% Et – OH
84	světle žlutá	5% Et – OH
85	světle žlutá	7% Et – OH
86	světle žlutá	7% Et – OH
87	světle žlutá	7% Et – OH
88	světle žlutá	7% Et – OH
89	světle žlutá	7% Et – OH
90	světle růžová	7% Et – OH
91	světle žlutá	7% Et – OH
92	světle žlutá	10% Et – OH
93	světle žlutá	10% Et – OH
94	světle žlutá	10% Et – OH

95	světle žlutá	10% Et – OH
96	světle žlutá	10% Et – OH
97	světle žlutá	10% Et – OH
98	světle žlutá	10% Et – OH
99	světle žlutá	10% Et – OH
100	světle žlutá	15% Et – OH
101	světle žlutá	15% Et – OH
102	světle žlutá	15% Et – OH
103	světle žlutá	15% Et – OH
104	světle žlutá	20% Et – OH
105	světle žlutá	20% Et – OH
106	žlutá	20% Et – OH
107	žlutá	25% Et – OH
108	žlutá	25% Et – OH
109	žlutá	25% Et – OH
110	žlutá	30% Et – OH
111	žlutá	30% Et – OH
112	žlutá	30% Et – OH
113	žlutá	35% Et – OH
114	světle žlutá	35% Et – OH
115	světle žlutá	35% Et – OH
116	světle žlutá	40% Et – OH
117	světle žlutá	40% Et – OH
118	světle žlutá	40% Et – OH
119	světle žlutá	45% Et – OH
120	světle žlutá	45% Et – OH
121	světle žlutá	45% Et – OH
122	světle žlutá	50% Et – OH
123	světle žlutá	50% Et – OH
124	světle žlutá	50% Et – OH
125	světle žlutá	55% Et - OH

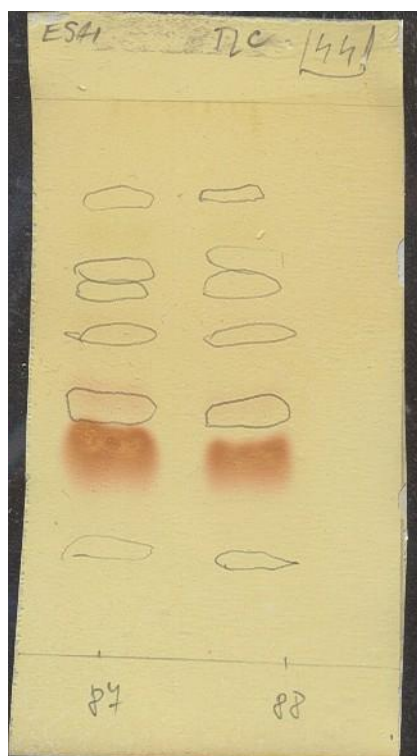




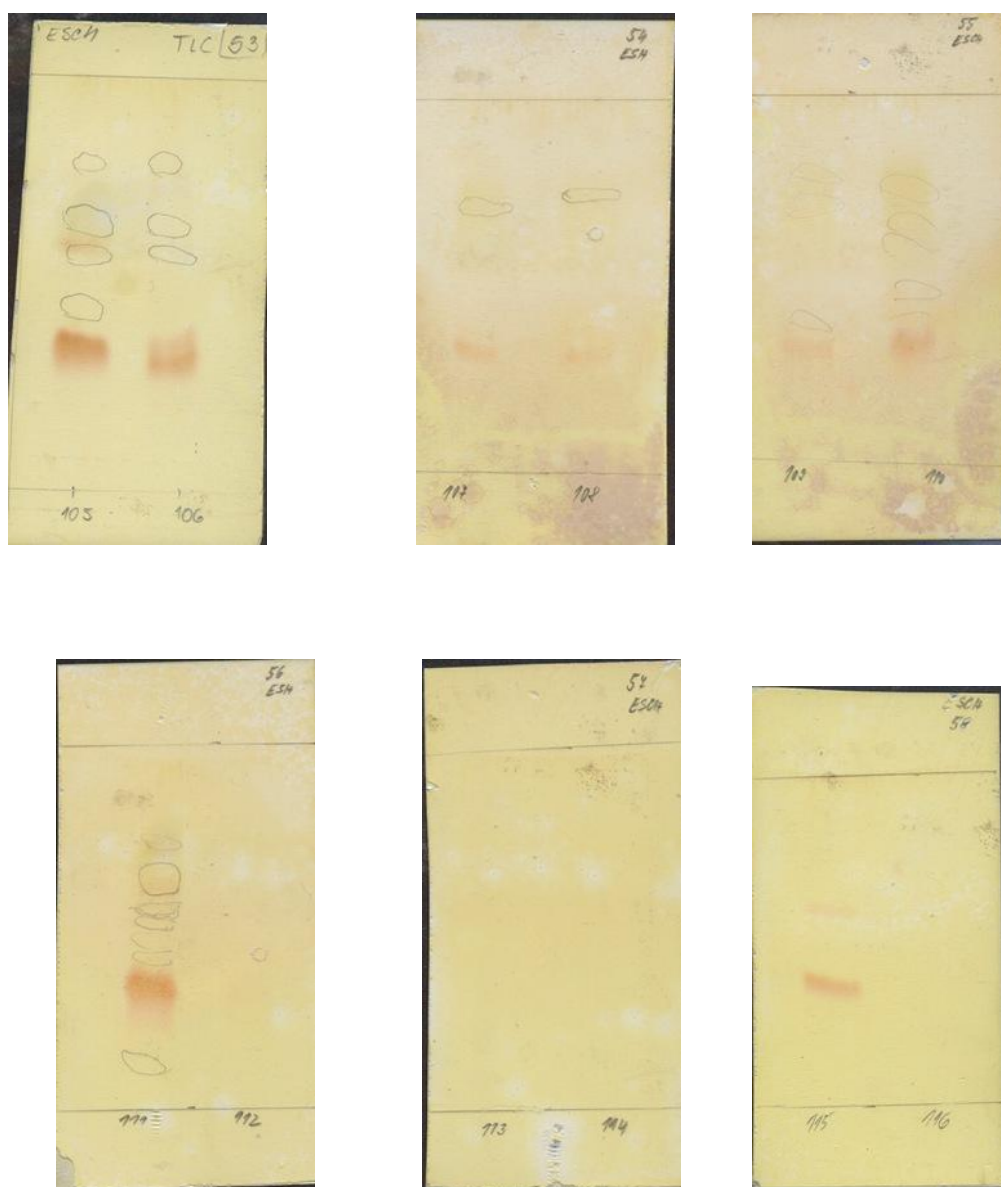












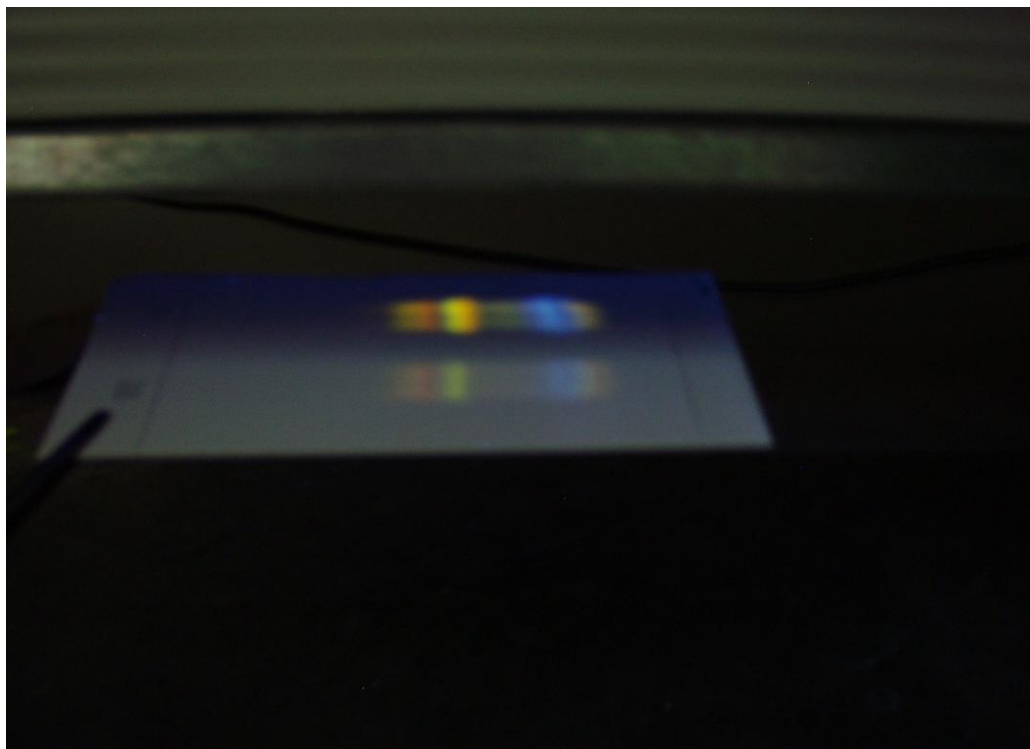
Obr. č.6: Získané chromatogramy (1 – 58)³⁰

Sloupcovou chromatografií získáváme 125 frakcí, každá o objemu 250 ml, které částečně odpaříme na rotační odparce za sníženého tlaku (1,067 kPa) při teplotě do 60°C. Frakce, které mají porovnáním TLC shodné zastoupení, spojíme. Ty, které jsou na základě TLC vhodné, rozdělí doktorka Karlíčková mezi nás tři diplomantky. Dále je zpracováváme a testujeme.

Spojením frakcí vznikají nové frakce ESCH:

ESCH 1 – 22	ESCH 59 – 72
ESCH 23	ESCH 73 – 91
ESCH 24	ESCH 92
ESCH 25	ESCH 93 – 95
ESCH 26 – 31	ESCH 96
ESCH 32 – 42	ESCH 97 – 103
ESCH 43 – 58	ESCH 104 – 106

Frakce číslo 23 (viz obr. č.6) zůstává samostatně vyčleněná jako ESCH 23. Úkolem je izolovat z ESCH 23 alkaloidy. Již v částečně odpařené frakci se ve zkumavce začínají objevovat světlé drobné krystaly.



Obr. č.7: Chromatogram ESCH 23 pod UV lampou³⁰



Obr. č.8: Chromatogram ESCH 23 po detekci činidlem³⁰

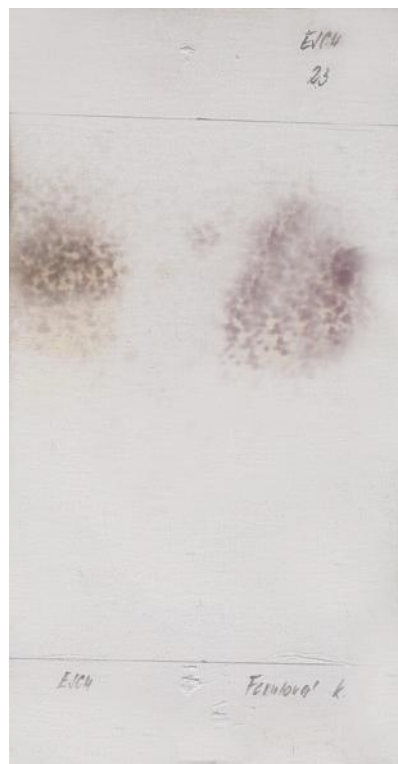
Dle rady necháme krystaly rozpustit a následně krystalizovat v pár kapkách methanolu, týden v lednici. Krystaly, které vznikly oddělíme a vzorek krystalů ESCH 23 nanese na TLC a detekujeme Dragendorfovým činidlem. Po detekci zjišťujeme, že krystalky nejsou alkaloidy, ale jiná látka. Na základě obrazu chromatogramu pod UV lampou a dle odkazů odborné literatury jsme se rozhodly testovat izolované krystaly ESCH 23 na přítomnost flavonoidů.^{14,16} Jako standardy volíme rutin, kvercetin, kys. kávovou a kys. ferulovou (isorhamnetin není k dispozici). Vhodná vyvíjecí soustava pro flavonoidy : Et – OH : kys. octová : voda v poměru 6 : 3 : 1 a detekčním činidlem je 1% roztok vanilinu v čistém Et – OH a 3% kys. chloristá v poměru 1 : 1. Z chromatogramů pod UV lampou usuzujeme, že vydělené krystaly ESCH 23 by mohly být kyselinou ferulovou či kvercetinem. Po postřiku detekčním činidlem chromatogram zahříváme nad elektrickým vařičem objevují se fialové zóny, což dokazuje přítomnost flavonoidů.

4 Výsledky měření

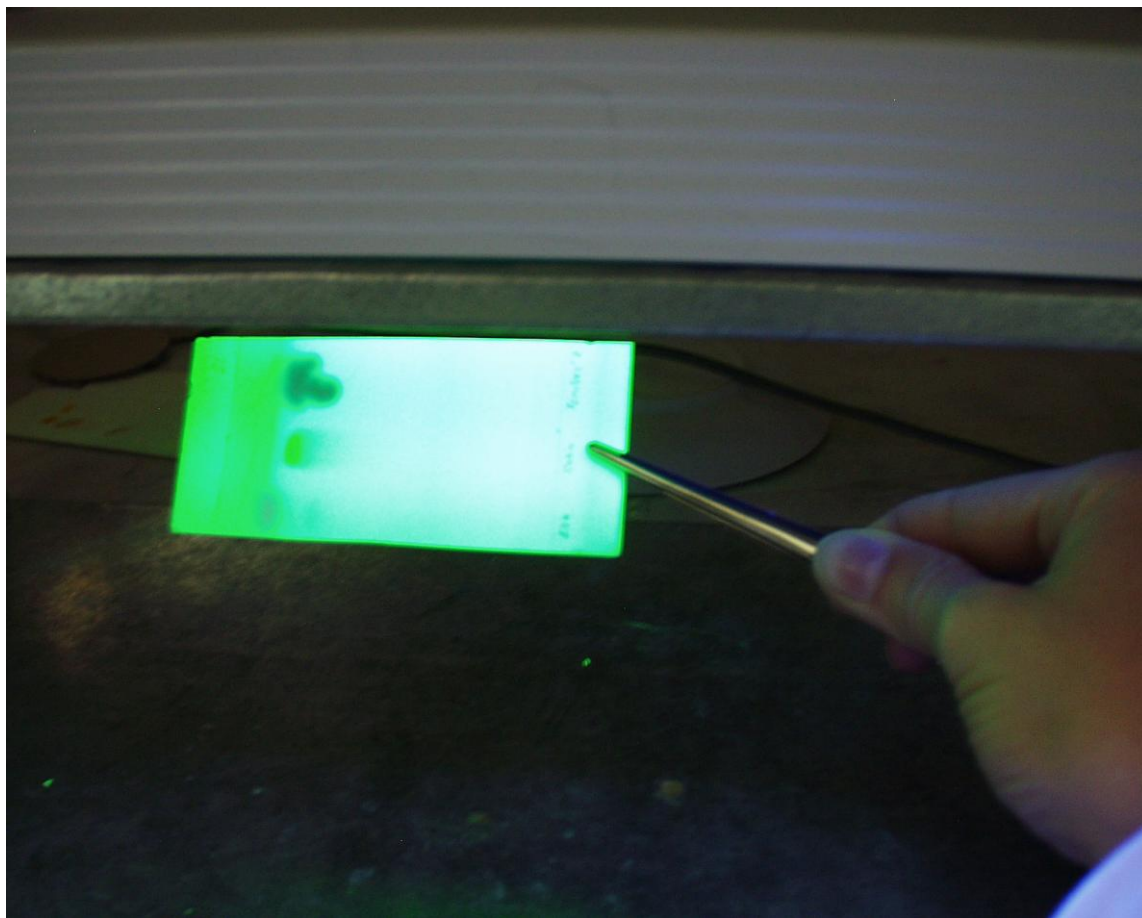
4.1 Výsledné chromatogramy

Obr. č.9: Chromatogram č.1 : vzorek ESCH 23, standardy- rutin,
k. ferulová

Chromatogram č.1 po detekci činidlem³⁰



Kontrolní chromatogram

Chromatogram č.1 pod UV lampou³⁰**Retenční faktory látek:**

$$R_f = L_{\text{ESCH23}}/L_{\text{CH}} = 6,20/7,60 = 0,82$$

$$R_f = L_{\text{rutin}}/L_{\text{CH}} = 5,90/7,60 = 0,78$$

$$R_f = L_{\text{ferulová k.}}/L_{\text{CH}} = 6,15/7,60 = 0,81$$

Poznámky:

L_{CH} – délka dráhy chromatogramu

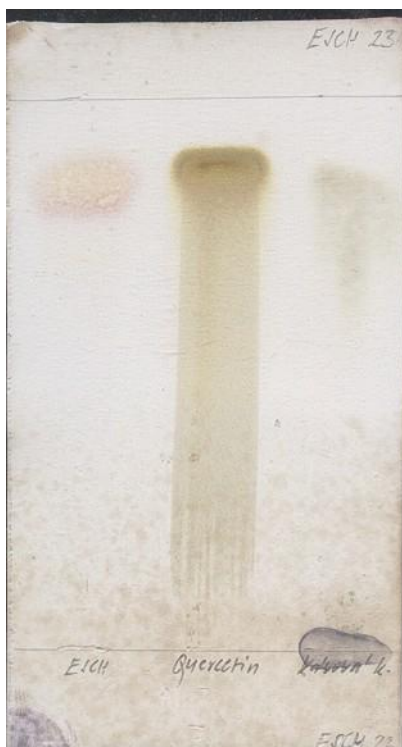
L_{ESCH23} – délka dráhy vzorku ESCH 23

L_{rutin} – délka dráhy rutinu

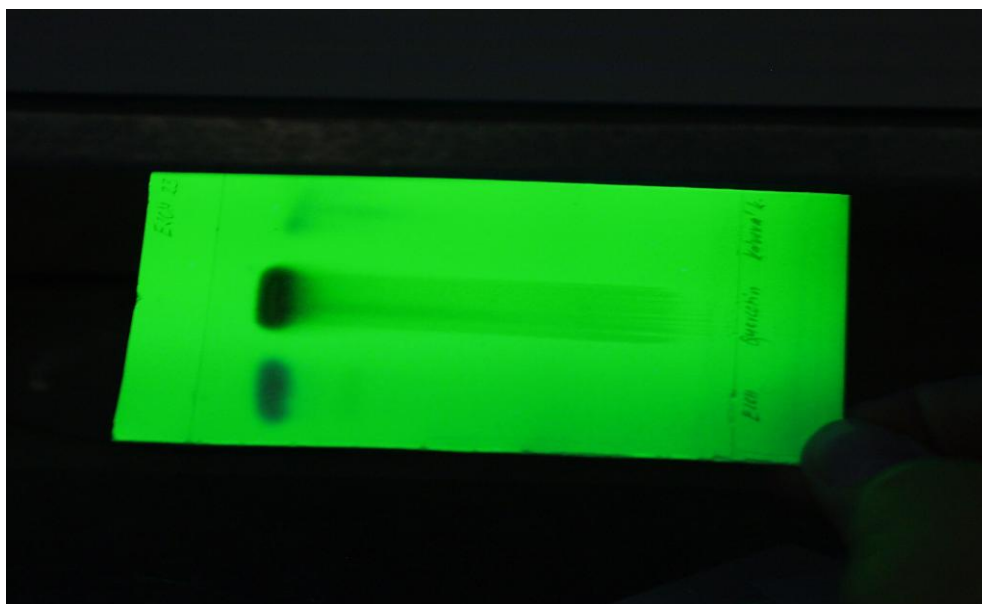
$L_{\text{ferulová k.}}$ – délka dráhy k. ferulové

Obr. č.10: Chromatogram č.2 : vzorek ESCH 23, standardy- kvercetin, k.kávová

Chromatogram č.2 po detekci činidlem³⁰



Chromatogram č.2 pod UV lampou³⁰



Retenční faktory látek:

$$R_f = L_{\text{ESCH23}}/L_{\text{CH}} = 6,25/7,20 = 0,87$$

$$R_f = L_{\text{kvercetin}}/L_{\text{CH}} = 6,40/7,20 = 0,88$$

$$R_f = L_{\text{kávová k.}}/L_{\text{CH}} = 6,10/7,20 = 0,85$$

Poznámky:

L_{CH} – délka dráhy chromatogramu

L_{ESCH23} – délka dráhy vzorku ESCH 23

$L_{\text{kvercetin}}$ – délka dráhy kvercetinu

$L_{\text{kávová k.}}$ – délka dráhy k. kávové

4.2 Hodnocení výsledků chromatografie

Retenční faktory

$$R_f = L_{\text{ESCH23}}/L_{\text{CH}} = 6,20/7,60 = 0,82$$

$$R_f = L_{\text{rutin}}/L_{\text{CH}} = 5,90/7,60 = 0,78$$

$$R_f = L_{\text{ferulová k.}}/L_{\text{CH}} = 6,15/7,60 = 0,81$$

$$R_f = L_{\text{ESCH23}}/L_{\text{CH}} = 6,25/7,20 = 0,87$$

$$R_f = L_{\text{kvercetin}}/L_{\text{CH}} = 6,40/7,20 = 0,88$$

$$R_f = L_{\text{kávová k.}}/L_{\text{CH}} = 6,10/7,20 = 0,85$$

Výsledek chromatografie není zcela jasný, potvrzujeme přítomnost flavonoidu, pravděpodobně se jedná o kyselinu ferulovou. Isorhamnetin bohužel nemáme k dispozici.

Na základě tohoto faktu jsme se rozhodly určit teplotu tání vzorku ESCH 23 na Koflerově bloku.

4.3 Teplota tání standardů

k. ferulová ³²	168°C – 172°C
kvercetin ³³	316°C
isorhamnetin ³⁴	311°C – 314°C

Měřením teploty tání krystalů zjišťujeme, že se jedná o kyselinu ferulovou. Naměřily jsme teplotu tání 170°C. Také barva zóny vzorku ESCH 23 na chromatogramu se podobá nejvíce standardu kyseliny ferulové.

4.4 Antioxidační aktivita

Flavonoidy obecně patří k přírodním látkám s antioxidační aktivitou. Měření antioxidační aktivity flavonoidu není předmětem této diplomové práce. Vzhledem k průběhu a závěru diplomové práce, zmiňuji alespoň úvodní informace k tématu antioxidační aktivity.

V posledních letech bylo získáno mnoho dokladů o tom, že v organismu vzniká řada reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS) a reaktivních forem dusíku (reactive nitrogen species – RNS) a že tyto látky mají značný fyziologický i patogenetický význam. Jde o látky, které pohotově reagují s různými biologickými strukturami – mastnými kyselinami a lipidy, aminokyselinami a proteiny, mononukleotidy a polynukleotidy (nukleovými kyselinami) i s řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a jiných součástí živé hmoty. Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. Za určitých okolností však působí jako toxické látky a jako dezinformační agenti, schopní organismus poškodit a dokonce ho usmrtit.²⁸

Volný radikál z „normálních“ molekul vzniká trojím způsobem: hemolytickým štěpením kovalentní (dvouelektrodové) chemické vazby, přičemž každý fragment získá jeden nepárový elektron, nebo přidáním jednoho

elektronu k normální molekule – redukcí, nebo naopak ztrátou jednoho elektronu, což je oxidace. Vznik radikálu může být iniciací celého řetězce dalších reakcí. Obecně bývají radikály vysoce reaktivní částice, protože se snaží doplnit si párový elektron, a tak jsou schopné rychle se navázat na jinou strukturu nebo elektron předat jiné molekule nebo jí ho odejmout. Radikálové reakce se tím propaguje do okolí. Teprve reakcí dvou radikálů se nepárové elektrony spojí ve dvojici a vzniká „normální molekula“.²⁸

Volným radikálům, které vznikají in vivo a mají řadu fyziologických funkcí (např. účast v protizánětlivých reakcích, v procesu fagocytosy), se v současnosti věnuje velká pozornost a sleduje se jejich působení na organismus při řadě nemocí. Jde především o výše zmíněné ROS a RNS. Tyto radikály působí na biologicky významné sloučeniny, pozměňují jejich strukturu a tím modifikují jejich funkci. Kaskáda reakcí iniciována radikály vede k následným změnám ve struktuře buněk, k poškození celých tkání, orgánů a důležitých funkcí v organismu.²⁹

Porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním reaktivních forem kyslíku a dusíku se nazývá oxidační stres. Může být vyvolán nadměrnou produkcí RONS, nedostatečnou funkcí antioxidačního ochranného systému nebo kombinací obou těchto nedostatků.²⁸

Reparativní procesy v organismu nemohou samy volně eliminovat poškození biomolekul, významnou roli při ochraně před volnými radikály hraje prevence, tj. redukce příčin jejich vzniku.

Jednou z možností, jak organismus chránit před vlivem exogenních i endogenních volných radikálů, je působení antioxidantů. Jsou to molekuly, které – jsou-li přítomny v malých koncentracích ve srovnání s látkami, jež by měly chránit – mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci těchto látek.²⁹

Kromě endogenních nízkomolekulárních antioxidantů, jako je glutathion, kyselina močová, koenzym Q a další, se v poslední době do centra pozornosti řadí mnoho látek přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají společně s potravou. Některé potraviny rostlinného původu tak vedle nutriční a energetické hodnoty mají důležitou roli jako zdroj antioxidantů. K přírodním látkám s antioxidačními účinky, které jsou přijímané potravou, jsou v první řadě tradičně řazeny antioxidační vitaminy C, E a karotenoidy. V poslední době se

však mnohem větší význam přikládá dalším přírodním látkám, zejména polyfenolickým sloučeninám. Mezi ně patří např. flavonoidy, katechiny a fenolické kyseliny. Zdrojem těchto látek jsou zelenina, ovoce, vláknina, čaje, vína a aromatické a léčivé rostliny. Celkový denní příjem polyfenolů z různých zdrojů byl odhadnut na 1 g a je tedy vyšší než příjem antioxidačních vitaminů. V řadě experimentálních studií bylo také prokázáno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidačních vitaminů. Klinické a epidemiologické studie rovněž prokazují korelaci mezi antioxidační aktivitou látek přijímaných v potravě a prevencí některých onemocnění např. kardiovaskulárních chorob, karcinogeneze, neurologických poruch nebo procesů stárnutí.²⁹

Z uvedených důvodů vzrůstá zájem stanovit antioxidační aktivitu různých látek rostlinného původu. Jeden z přístupů ve výzkumu přírodních antioxidantů je testování reaktivity individuálních izolovaných látek vůči jednotlivým volným radikálům. Slouží především k odvození vztahů mezi strukturou a reaktivitou příslušných sloučenin. Většinu přírodních antioxidantů však přijímáme jako součást složitých směsí, jejichž složky mohou reagovat s různými radikály různými mechanismy, mohou též na sebe vzájemně působit (synergicky i inhibičně). Proto je také snaha charakterizovat antioxidační aktivitu směsných vzorků i jako celku. Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí byl zaveden pojem celková antioxidační aktivita TAA (total antioxidant activity). TAA je parametrem, který kvantifikuje kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat radikály. Tento pojem je však v mnoha publikacích používán v širším významu a rozmanitost používaných metod při jejím stanovení je značná.²⁹

5 Diskuse a závěr

Cílem této diplomové práce bylo podrobněji prozkoumat nať z *Eschscholzia californica* Cham. z hlediska obsahových látek, doplněný o základní hodnocení biologických účinků rostlinných metabolitů. Provedení odborné rešerše, zpracování výtřepku J1, kvartérní jodidy kyselé, z nati *Eschscholzia californica* Cham., dělení perspektivní frakce, izolace kvarterních alkaloidů a identifikace získaného alkaloidu, testování biologické aktivity alkaloidu.

Příprava extraktu (byla cílem a úkolem jiné diplomové práce), separace obsahových látek kolonovou chromatografií s následnou TLC frakcí, byla provedená v laboratoři na katedře farmaceutické botaniky a ekologie.

Odborná rešerše zabývající se biologickými účinky a klinickým použitím *Eschscholzia californica* je uvedena na s. 30 – 34.

Součástí odborné rešerše je též klinická studie:

Dvojitě zaslepená, randomizovaná, placebo kontrolovaná studie hodnotící účinnost a bezpečnost přesně stanoveného množství kombinace extraktů z rostlin *Crataegus oxyacantha* a *Eschscholzia californica* a magnesia u mírných a středně mírných úzkostí. (s. 34 – 53)

Stručná charakteristika, rozdělení skupin a vzorce zástupců jednotlivých skupin izochinolinových alkaloidů jsou též součástí odborné rešerše. (s.13 – 28)

Úkolem bylo zpracovat výtřepok J1, což jsou kvartérní alkaloidy, které se získaly po odstranění terciálních bází z nati s kořeny *Eschscholzia californica* Cham. (s. 64 – 71)

Náplní pro kolonovou chromatografii byl silikagel a jako eluční činidlo jsme použily čistý CHCl_3 , ke kterému jsme postupně přidávaly 95% Et-OH. Při následném testování frakcí TLC jsme použily tuto vyvíjecí soustavu:

Ethanol : octová kyselina : voda v poměru 6 : 3 : 1.

Jako detekční činidlo jsme zvolily roztok složený z:

5 ml Dragendorffova činidla, 10 g kyseliny vinné, 50 ml vody.

Porovnáním TLC, z hlediska zastoupení obsahových látek, byly některé frakce shodné, a proto jsme je spojily. Dále proběhlo rozdělení perspektivních frakcí mezi nás tři diplomantky.

Dostala jsem za úkol podrobněji prostudovat frakci označenou jako ESCH 23. Dle rady jsem nechala frakci ESCH 23 krystalizovat v methanolu za chladu. Izolovaly se světlé bílé až žlutavé krystaly, které jsem testovala na přítomnost alkaloidů. Ukázalo se, že krystaly z frakce ESCH 23 nejsou perspektivní v zastoupení alkaloidů.

Rozhodly jsme se testovat izolované krystaly na základě obrazu chromatogramu pod UV lampou a též na základě odborných publikací na přítomnost flavonoidů.^{14,16} Při následném testování získaných krystalů jsme použily tuto vyvíjecí soustavu:

Ethanol : octová kyselina : voda v poměru 6 : 3 : 1.

Jako detekční činidlo jsme zvolily roztok složený z:

1% roztoku vanilinu : 3% kyseliny chloristé v poměru 1 : 1.

Zvolené standardy flavonoidů: rutin, kvercetin, k. kávová, k. ferulová a isorhamnetin (ten bohužel nebyl k dispozici). Na chromatogramech se objevily temně fialové zóny, což prokázalo přítomnost flavonoidu viz. obrázek č.9 a č.10, chromatogram č.1 a č. 2. S největší pravděpodobností se jedná o kyselinu ferulovou.

Výsledek chromatografie jsme dále ověřily měřením teploty tání krystalů na Koflerově bloku. Teplota tání krystalů ESCH 23 je 170°C, což odpovídá teplotě tání kyseliny ferulové.

Měřením teploty tání krystalů a shodnou barvou zóny ESCH 23 a standardu na chromatogramu jsme prokázaly, že se tedy jedná o kyselinu ferulovou.

Flavonoidy obecně patří k přírodním látkám s antioxidační aktivitou. Měření antioxidační aktivity flavonoidu není předmětem této diplomové práce. Z důvodu neočekávaného výsledku diplomové práce jsem zmínila alespoň úvodní informace k tématu antioxidační aktivity. (s.89 – 92)

Vzhledem k závěru této diplomové práce neproběhlo testování biologické aktivity alkaloidů vůči erytrocytární acetylcholinesterase.

6 Abstrakt

Křečková, M.: Biologický účinek rostlinných metabolitů I. Izolace alkaloidů z *Eschscholzia californica* Cham. Diplomová práce, Karlova Univerzita v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra Farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2009, 102 s.

Tato diplomová práce se týká fytochemického výzkumu výtřepku J1, kvartérní jodidy kyselé, z nati taxonu *Eschscholzia californica* Cham. Jedná se o separaci obsahových látek kolonovou chromatografií s následnou TLC frakcí, která byla provedená v laboratoři na Katedře Farmaceutické botaniky a ekologie.

Krystaly, které se podařilo izolovat z frakce označené jako ESCH 23, patří mezi látky ze skupiny flavonoidů, konkrétně jde o kyselinu ferulovou.

7 Literatura

1. Opletal, L.: Obsahové látky rostlin jako potenciální léčiva Alzheimerovy choroby. Léčivé rostliny 5/2007 (XLIV).
2. Lincová, D., Hassan Farghali et al.: Základní a aplikovaná farmakologie. Druhé, doplněné a přepracované vydání, Galen 2007, s.144.
3. Bruneton, J.: Pharmacognosy, intercept Ltd 199, 2end edition, Lavoisier publishing, s. 890 – 892, 894 – 897, 899, 907, 913 – 914, 918, 919, 925.
4. Jahodář, L.: Farmakobotanika, semenné rostliny. Karolinum, Praha 2006, s. 258
5. Blaschek, W., Ebel, S., Hackenthal, E., Holzgrabe, U., Keller, K., Reichling, J.,Schulz, V.: HagerROH 2006. Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe. CD – Realisierung: Informatik II., Universität Würzburg, [Programmversion 6.1], Springer Medizin Verlag Heidelberg 2006.
6. Rolland, A., Fleurentin, J., Lanhers, MC., Younos, C., Misslin, R., Mortier, F., Pelt, JM.: Planta Med 57, 213 1991, HagerROM 2006, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
7. Weiss, RF.: Lehrbuch der Phytotherapie, 6. Aufl., Hippokrates Verlag, Stuttgart 1984. HagerROM 2006, Springer Medizin Verlag Heidelberg
8. Berger, Bd. 4, s. 222 – 223. HagerROM 2006, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
9. Gertig H. „Alkaloids of Eschscholtzia californica“ Cham. 3 Preparative separation of alkaloid fractions obtained from benzene root extract. (Alkaloidy v Eschscholtzia californica. Preparativní separace alkaloidních frakcí získaných z benzenového extraktu kořenu) Acta Poloniae Pharmaceutica 1965; 22: 271-9
10. Alkaloid content of Eschscholtzia californica. (Obsah alkaloidů v Eschscholtzia californica) Dopke W, Fritsch G. Pharmazie 1970; 25: 203-4.
11. Granger I, Serradeil-le Gal C, Augereau JM, Gleye J. Laboratoire de Pharmacognosie, Faculte des Sciences Pharmaceutiques, Toulouse, Francie. Benzophenanthridine alkaloids isolated from Eschscholtzia californica cells suspension cultures interact with vasopressin (V1)

- receptors. (Benzofenanthridinové alkaloidy izolované ze suspenzní kultury buněk *Eschscholtzia californica* reagují vzájemně s receptory vazopresinu V1) *Planta Medica* 1992; 58: 35-8.
12. Kutchan TM. Laboratorium fur Molekulare Biologie, Universitat Munchen, Německo, Heterologous expression of alkaloid biosynthetic genes: a review. (Heterologní exprese biosyntetických genů alkaloidů: přehled) *Gene* 1996; 179: 73-81.
13. Tanahashi T, Zenk MH. Lehrstuhl fur Pharmazeutische Biologie, Universitat Munchen, Západní Německo. New Hydroxylated benzo[c]phenanthridine alkaloids from *Eschscholtzia californica* cell suspension cultures. (Nové benzo[c]fenanthridinové alkaloidy hydroxylované ze suspenzní kultury buněk *Eschscholtzia californica*) *Journal of Natural Products* 1990; 53: 579-86.
14. Sando, C.E., Bartlett, H.H.: *J. Biol. Chem.* 41, s.495 – 501, 1920. *Planta Medica* 62 (1996) s.188.
15. Luna Iain, Manju Tripathi a Vidiya, B. Pandey: Department of Medical Chemistry, Institute of Medical Sciences, Banaras Hindu University, Varanasi – 221 005, Indie.
16. Beck, M., A. Häberlein, H.: *Phytochemistry*, 50, s. 329 – 332, 1999. *Journal of Natural Products*, 2006, Vol. 69, No. 3, s. 432, 435.
17. Marek, R., Humpa, O., Dostál, J., Slavík, J., Sklenář, V.: *Magn. Reson. Chem.*, zasláno do tisku. Laboratoř Struktury a dynamiky biomolekul, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno.
18. Witkowski, M. Stefaniak, L., Webb, G.A.: *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* 18, 1, 1986.
19. Griesinger, C., Schwalbe, H., Schlenker, J., Sattler, M.: *Two – dimensional NMR Spectroscopy*, s. 457, VCH Publisher 1994.
20. Hurd, R.E.: *J. Magn. Reson.* 87, 422, 1990.
21. Marek, R., Králík, L., Sklenář, V.: *Tetrahedron Lett.* 38, 665, 1997.
22. Willker, W., Leibfritz, D., Kersebaum, R., Bermel, W.: *Magn. Reson. Chem.* 31, 287, 1993.

23. Biologická účinnost a nejvýznamnější klinické použití *Eschscholzia californica* popsané v literatuře:

²Vincieri FF, Celli S, Mulinacci N, Speroni E. *Pharmaceutical Sciences Department, Florencie, Itálie. An approach to the study of the biological activity of Eschscholzia californica* Cham. (První pokus studovat biologický účinek *Eschscholzia californica* Cham.). *Pharmacol Res Comm* 1988; 20 (Suppl 5): 41-4).

³Kleber E, Schneider W, Schafer HL, Elstner EF. *Organon International BV, Oberschleissheim, Německo. Modulation of key reactions of the catecholamine metabolism by extracts from Eschscholtzia californica and Corydalis cava. (Modulace klíčových reakcí metabolismu katecholaminů extraktem z Eschscholtzia californica a Corydalis cava).* *Arzneimittel-Forschung Drug Research* 1995; 45: 127-31).

⁴Reimeier C, Schneider I, Schneider W, Schafer HL, Elstner EF. *Steiferwald Arzneimittelwerk GmbH, Darmstadt, Německo. Effects of ethanolic extracts from Eschscholtzia californica and Corydalis cava on dimerization and oxidation of enkephalins. (Účinky etanolického extraktu z Eschscholzia californica a Corydalis cava na dimerizaci a oxidaci enkefalinů)* *Arzneimittel-Forschung Drug Research* 1995; 45: 132-6).

⁵Blechert S, Brodschelm W, Holder S, Kammerer L, Kuchtan T M, Mueller MJ, Xia ZQ, Zenk MH. *Lehrstuhl fur Pharmazeutische Biologie, Universitat Munchen, Německo. The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. (Dráha (reakce) kyseliny oktadekanové: signální molekuly pro regulaci sekundární dráhy (reakce)).* *Proc Nat Acad Sci USA.* 1995; 92: 4099-105).

⁶Harborne JB, Barter H. *Phytochemical Dictionary. (Fytochemický slovník)* Taylor & Francis, Londýn, 1993, pag. 219.

⁷Vincieri FF, Celli S, Mulinacci N, Speroni E. *An approach to the study of the biological activity of Eschscholtzia californica. (První pokus studovat biologický účinek Eschscholtzia californica).* *Pharmacol. Res. Comm.,* 1988; 20 (Suppl. 5): 41-44

⁸*Adverse Effects of Herbal Drugs. (Nepříznivé účinky bylinných léků.)* De Smet PAGM (Ed.) Springer – Verlag, Berlin 1993, p. 41.

24. Rolland, A., Fleurentin, J., Lanhers, MC., Younos, C., Misslin, R., Mortier, F., Pelt, JH.: *Planta Medica* 57, 213, 1991. HagerROM 2006, Springer Medizin Verlag Heidelberg.

25. Michel Hanus, Jacqueline Lafon, Marc Mathieu: Double – blind, randomised, placebo – controlled study to evaluate the efficacy and safety of a fixed combination containing two plant extracts *Crataegus oxyacantha* and *Eschscholzia californica* and magnesium in mild – to – moderate anxiety disorders.

(Dvojitě zaslepená, randomizovaná, placebo kontrolovaná studie hodnotící účinnost a bezpečnost přesně stanoveného množství

kombinace extraktů z rostlin *Crataegus oxyacantha* a *Eschscholzia californica* a *magnesia* u mírných a středně mírných úzkostí.)

Current Medical research and opinion vol. 20, No.1, 2004, s.63 – 71

¹ Martin C, Maurice-Tison S, Tignol J. [Anxiety disorders in general practice: frequency-treatment. A survey of the Aquitaine Sentinel Network]. (Úkostné poruchy v praxi praktického lékaře: frekvence-léčba. Průzkum prováděný Aquitaine Sentinel Network) [French]. *Encephale* 1998;24:120-4

² Pelissolo A, Boyer P, Lepine JP, Bissierbe JC. [Epidemiology of use of anxiolytic and hypnotic drugs in France and in the world.] (Epidemiologická studie použití anxiolytických a hypnotických léků ve Francii a na celém světě.) [French]. *Encephale* 1996;22:187-96

³ Edwards JG. Clinical anxiety and its treatment. *Neuropeptides*. (Klinická úzkost a její léčba. *Neuropeptidy*). 1991;19 (Suppl):1-10

⁴ Pelissolo A. [Detection and diagnosis of anxiety]. (Detekce a diagnóza úzkosti) [French]. *Rev Prat* 1999;49 (Suppl 14):S5-10

⁵ Ashton H. Guidelines for the rational use of benzodiazepines. When and what to use. (Guideliny pro racionální užití benzodiazepinů. Kdy a co užívat.) *Drugs*. 1994;48:25-40

⁶ Cohn JB, Rickels K. A pooled double-blind comparison of the effects of busperidone, diazepam and placebo in women with chronic anxiety. (Společné dvojité zaslepené srovnání efektu busperidonu, diazepamu a placeba u žen s chronickou úzkostí). *Curr Med Res Opin* 1989;11:304-20

⁷ Tyrer P., Murphy S, Riley P. The benzediazepine withdrawal symptom questionnaire. (Dotazník týkající se abstinenčních symptomů benzodiazepinu). *J. Affect Dis* 1990;19:53-61

⁸ ANAES. Guidelines Department. Diagnosis and outpatient management of generalised anxiety disorder in adults. (Diagnóza a ambulantní léčba generalizovaných úzkostných poruch u dospělých). březen 2001, Guideliny týkající se klinické praxe [online] jsou dostupné na <http://www.anaes.fr/ANAES/framedf.nsf> (zpřístupněno 2. září 2003)

⁹ Bourin M, Bougerol T, Guitton B, Broutin E. A combination of plant extracts in the treatment of outpatients with adjustment disorder with anxious mood: controlled study versus placebo. (Kombinace rostlinných extraktů při léčbě ambulantních pacientů s poruchami přizpůsobivosti s úzkostnou náladou: kontrolovaná studie versus placebo.) *Fundam Clin Pharmacol* 1997;11:127-32

¹⁰ Walker AF, Marakis G, Morris AP, Robinson PA. Promising hypotensive effect of hawthorn extract: a randomised double-blind pilot study of mild, essential hypotension. (Slibný hypotenzí účinek extraktu z hlohu: dvojité zaslepená, randomizovaná, pilotní studie mírné esenciální hypotenze.) *Phytother Res* 2002;16:48-54

- ¹¹Schäfer HL, Schafer H, Schneider W, Elstner EF. Sedative action of extract combination of *Eschscholtzia californica* and *Corydalis cava*. (Sedativní účinek kombinace extraktu z *Eschscholtzia californica* a *Corydalis Cava*.) *Arzneimittelforschung* 1955;45:124-6
- ¹²Grimaldi BL. The central role of magnesium deficiency in Tourette's syndrome. Causal relationship between magnesium deficiency, altered biochemical pathways and symptoms relating to Tourette's syndrome and several reported comorbid conditions. (Ústřední role nedostatku magnesia u Tourettova syndromu. Kauzální vztah mezi nedostatkem magnesia, upravená biochemická dráha a symptomy související s Tourettovým syndromem a několik hlášených případů komorbiditu). *Med. Hypotheses* 2002;58:47-60
- ¹³American Psychiatric Association. 300.02 Anxiété généralisée (Trouble). In: A.P.A. Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-III-R). Traduction Française [French]. Paris: Masson, 1989:283-6
- ¹⁴Hamilton M. The assessment of anxiety states by rating. (Hodnocení stavů úzkosti.) *Br. J Med Psychol* 1959;32:30-5
- ¹⁵Anonymous. Clinical global impressions. (Neznámí autoři. Celkový klinický dojem.) *Psychopharmacol Bull* 1985;21:839-43
- ¹⁶Morton S, Lader M. Studies with alpidem in normal volunteers and anxious patients. (Studie prováděné s alpidemem u zdravých dobrovolníků a pacientů s úzkostí.) *Pharmacopsychiatry* 1990;23 (Suppl. 3):120-3
- ¹⁷Aufdembrinke B. Abecarnil, A new beta-carboline in the treatment of anxiety disorders. (Nový beta-karbolin při léčbě úzkostných poruch) *Br. J. Psychiatry* 1998; 34 (Suppl.):55-63
- ¹⁸Lader M, Scotto JC. A multicentre double-blind comparison of hydroxyzine, buspirone and placebo in patients with generalized anxiety disorder. (Multicentrické dvojité zaslepené srovnání hydroxyzinu, buspironu a placeba u pacientů s generalizovanou úzkostnou poruchou). *Psychopharmacology* 1998;139:402-6
- ¹⁹Agnolia A, Nappi G., Sandrini G, De Romanis F. Role of magnesium administration in neuronal hyperexcitability syndrome. (Úloha podávání magnesia u syndromu neurální hyperexcitability). In: Itokawa Y, Durlach J, editors. *Magnesium in Health Disease*. Londýn-Paříž: John Libbey & Co, 1989: 299-305
- ²⁰Bech P. Methods of evaluation of psychoactive drugs. (Metody hodnocení psychoaktivních léků). *Recenti Prog. Med.* 1989;80:706-11
- ²¹Anonymous. Venlafaxine and generalised anxiety disorder: new preparation. Minimise recourse to drugs. (Neznámí autoři. Venlafaxin a generalizované úzkostné poruchy: nový preparát. Minimalizuje opětovné užívání léku). *Prescrire Int.* 2001;10:131-4
- ²²Legrain M. Rapport du Groupe de Réflexion sur l'Utilisation des Hypnotiques et des Tranquillisants en France [French]. Paříž: SNIP, 1990

26. Opletal, L., Drašar, P.: *Fytochemické metody*, Karolinum Praha 1994, s. 38, 45, 49, 50, 57, 63, 83, 95, 102, 103, 113, 130, 132.
27. Doležal, J.: *Biologická aktivita obsahových látek rostlin VIII. Vliv alkaloidů z různých rostlinných taxonů na acetylcholinesterázu*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra Farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2008, 65 s.
28. Štípek, S. a kol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*, Vyd. Grada, Praha 2000, s. 21 – 24, 69.
29. Paulová, H., Bochořáková H., Táborská, E.: *Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro*, *Chemické listy* 98, 2004, s. 174 – 179.
30. Karlíčková, J.: Foto pořízeno na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie.
31. <http://botany.cz/cs/eschscholzia-californica/> (napsal Kovář, L. 12.7.2007)
32. <http://en.wikipedia.org/wiki/Ferulic-acid>
33. <http://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin>
34. <http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/isorhamnetin.php>
35. Stahl, E.: *Thin-Layer Chromatography. A laboratory handbook*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1969, s. 1041

8 **Abstract**

Křečková, M.: Biological effect of plant metabolites I. Isolation of alkaloids from *Eschscholzia californica* Cham. Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové 2009, 102 p.

My diploma thesis was intended on phytochemical study of extract J1, quaternary acid iodides, of *Eschscholzia californica* Cham. It concerns the separation of content substances chromatography column with following TLC fraction which was realized at the Department of Pharmaceutical Botany and Ecology.

Crystals which were separated from the fraction marked ESCH 23 belong to the group of flavonoids substances. In the concrete, it concerns ferulic acid.